



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“ESTUDIO DE CASO DE UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA  
EMBRIONARIA EN UN HATO DE VACAS CEBUÍNAS EN EL  
TRÓPICO HÚMEDO DE MÉXICO”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRIA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PRESENTA:**

**URIEL VERGARA RAMÍREZ**

**TUTOR: DR. ARMANDO ENRIQUE ESPERÓN SUMANO. FES-CUAUTITLAN**

**COMITÉ TUTORAL: DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ. FMVZ**

**DRA. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON. FES-CUAUTITLAN**

**México, D.F., Diciembre de 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis de Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia fue comparar a través de un estudio de caso tres protocolos en un programa de sincronización de estros y transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) para seleccionar el que mejor porcentaje de gestación (PG) produzca. De un hato de 60 hembras promedio con encaste cebuino en una explotación extensiva, se seleccionaron mediante palpación transrectal un grupo de hembras vacías por año (2009, 2010, 2011), incluidas hembras lactantes en anestro y no lactantes ciclando. A las cuales se les aplicó uno de tres protocolos (A, B, C) en un programa de TETF. En el A (n=25), las receptoras con una CC de 2.5 promedio, recibieron el día 0 un implante auricular de 3 mg de norgestomet (N) más 3 mg de N y 5 mg de valerato de estradiol (VE) i.m. El día 9 se retiró el implante. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron 20/25 (80%) vacas que presentaron CL, con embriones obtenidos *in vivo* (grado 1, estadíos 6 y 7) congelados en glicerol de la raza Blonde D'Aquitaine. En el B (n=20), las receptoras con una CC de 2.5 promedio, recibieron el día 0 un dispositivo intravaginal de 1.9 gr. de progesterona (CIDER), 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE). El día 8 se retiró el CIDER, más 0.15 mg i.m. de prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α). El día 9, 1 mg i.m. de BE. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron 16/20 (80%) vacas que presentaron CL, con embriones obtenidos *in vivo* (grado 1, estadíos 6 y 7) congelados en glicerol de la raza Brangus Negra. En el C (n= 25), las receptoras tuvieron una CC de 2.8 promedio, se suplementó desde treinta días antes del inicio del protocolo con 2 Kg de concentrado con 18% de proteína cruda (PC), 80 g de sales minerales: Mg, Ca, P, Na; 40 ml de aceite de maíz, diariamente y hasta la fecha del diagnóstico de gestación; recibieron el día 0 CIDER, 1 mg i.m. de BE, 35 mg Selenio/350 mg vitamina E i.m. El día 8 se retiró el CIDER, 0.15 mg i.m. PGF<sub>2</sub>α, 300 u.i. i.m. de gonadotropina coriónica equina (eCG). El día 9, 0.5 mg i.m. de BE. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 fueron transferidas 23/25 (92%) vacas que presentaron CL, con dos embriones

obtenidos *in vitro* (grado 1, estadios 7 y 8) frescos de la raza Hereford. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba “t” para proporciones, para ello se utilizó el programa Micro-STAT en su versión 1.1, comparando tres protocolos de TETF basándose en el PG, se obtuvieron: 35%, 18.75% y 56.52%, con los protocolos A, B y C ( $P < 0.01$ ), respectivamente. Se concluye que el tercer protocolo aplicado en el año 2011 en un programa de TETF en receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* en el trópico húmedo mexicano es el que mayor porcentaje de gestación produce.

Palabras claves: sincronización, estro, transferencia embrionaria, *Bos indicus* x *Bos taurus*, porcentaje de gestación.

## ABSTRACTS

The objective of this master's thesis in veterinary medicine and animal husbandry was through a case study comparing three protocols in a programme of embryo transfer and synchronization of estrus in time fixed (TETF) to select the one best percentage of gestation (PG) produce. Of a group of 60 females average with *Bos indicus x Bos taurus* in an extensive operation, selected by means of transrectal palpation a group of non-pregnant females per year (2009, 2010, 2011), including nursing in anoestrus and non nursing females cycling. To which one of three protocols (A, B, C) in a FTET program was applied to them. In the A (n=25), the recipients with one CC of 2.5 average, received norgestomet (N) ear implant of 3 mg plus 3 mg of N and 5 mg of valerate of estradiol (EV) i.m. on day 0. On day 9 retired implant. Day 10 is considered the day of oestrus. Day 17 20/25 (80%) cows that displayed CL, with embryos obtained *in vivo* transferred themselves (degree 1, stages 6 and 7) frozen in glycerol of the race Blonde D'Aquitaine. In the B (n=20), the recipients with one CC of 2.5 average, received day 0 an intravaginal device of 1.9 gr. of progesterone (CIDER), 2 mg i.m. of benzoate of estradiol (EB). Day 8 retired the CIDER, 0.15 mg i.m. of F2 $\alpha$  prostaglandin (PGF2 $\alpha$ ). Day 9, 1 mg i.m. of EB. Day 10 is considered the day of oestrus. Day 17 16/20 (80%) cows that displayed CL, with embryos obtained *in vivo* transferred themselves (degree 1, stages 6 and 7) frozen in glycerol of the race Brangus. In the C (n= 25), the recipients had one 2.8 CC of average, each cow supplement from thirty days before the beginning of the protocol with 2 kg of concentrated with 18% of crude protein (CP), 80 g of mineral salts: Mg, Ca, P, Na; 40 milliliter of corn oil, daily and to date of diagnose of gestation; they received day 0 a CIDER, 1 mg i.m. of EB, 35mg Selenio/350mg vitamin E i.m. Day 8 retired the CIDER, 0.15 mg i.m. PGF2 $\alpha$ , 300 u.i. i.m. of equine chorionic gonadotrophin (eCG). Day 9, 0.5 mg i.m. of EB. Day 10 is considered the day of oestrus. Day 17 23/25 (92%) cows that displayed CL, with two embryos obtained *in vitro* (degree 1, stages 7 and 8) fresh of the Hereford race were transferred. For the statistical analysis test "t" for

proportions was applied, for it was used the Micro-STAT program in its version 1.1, comparing three protocols of FTET using the GP. The obtained PG were: 35%, 18.75% and 56.52%, with the protocols A, B and C ( $P < 0.01$ ), respectively. One concludes that the third protocol applied in 2011 in a program of receptions TETF in *Bos indicus* x *Bos taurus* in the Mexican humid tropic is the one that greater percentage of gestation produces.

**Keywords:** synchronization, oestrus, embryonic transference, *Bos indicus* x *Bos taurus*, percentage of gestation.

CONTENIDO	Página
Resumen _____	II
Abstract _____	IV
Lista de Cuadros _____	VIII
Lista de figuras _____	IX
1.- Introducción _____	1
2.- Revisión de literatura _____	8
2.1.- Historia de la Transferencia embrionaria (TE) _____	8
2.2.- Dinámica folicular del ciclo estral bovino _____	12
2.2.1.- Crecimiento folicular en ondas _____	13
2.2.2.- Endocrinología y desarrollo folicular _____	16
2.2.3.- Desarrollo folicular en el posparto _____	20
2.2.4.- Desarrollo folicular en el periodo prepúber _____	21
2.2.5.- Función del cuerpo lúteo durante el ciclo estral _____	22
2.3.- Mecanismos del control hormonal de protocolos de transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF) _____	24
2.4.- Selección y manejo de donadoras _____	31
2.5.- Técnicas de Superovulación (SO) e Inseminación Artificial (IA) de donadoras _____	32
2.6.- Desarrollo y morfología embrionaria _____	39
2.6.1.-Técnica de obtención, búsqueda y evaluación embrionaria _____	41
2.6.2.-Técnicas de congelación y descongelación embrionaria _____	51
2.7.- Método de transferencia embrionaria por vía transcervical _____	55
2.8.- Selección y manejo de receptoras _____	56
2.9.- Transferencia embrionaria en receptoras cebuínas en el trópico _	58
2.9.1.- Eficiencia reproductiva en vacas cebuínas _____	58
2.9.2.- Características del ciclo estral en vacas <i>Bos indicus</i> _____	60
2.9.3.- Protocolos de Transferencia Embrionaria a Tiempo Fijo (TETF) de receptoras en ambiente tropical _____	61
2.9.4.- Condición Corporal (CC) en el ganado cebuino _____	63

<b>3.- Hipótesis</b> _____	<b>65</b>
<b>4.- Objetivos Generales</b> _____	<b>65</b>
<b>5.- Material y Métodos</b> _____	<b>65</b>
<b>6.- Análisis Estadístico</b> _____	<b>69</b>
<b>7.- Resultados</b> _____	<b>70</b>
<b>8.- Discusión</b> _____	<b>73</b>
<b>9.- Conclusiones</b> _____	<b>76</b>
<b>10.- Recomendaciones</b> _____	<b>76</b>
<b>11.- Abreviaturas</b> _____	<b>77</b>
<b>12.- Bibliografía</b> _____	<b>79</b>

<b>Lista de Cuadros:</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1. Codificación de las estructuras embrionarias _____</b>	<b>49</b>
<b>Cuadro 2. Comparación del intervalo entre partos (IEP) en el trópico mexicano _____</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 1. Comparación de los protocolos de TETF usando el porcentaje de gestación (nº de receptoras preñadas/transferidas) en <i>Bos indicus</i> X <i>Bos taurus</i> en el trópico húmedo _____</b>	<b>70</b>
<b>Tabla 2. Eficiencia de los protocolos de TETF (nº de receptoras tratadas/transferidas) y sus porcentajes de gestación en <i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i> en el trópico húmedo de México en los años 2009, 2010 y 2011 _____</b>	<b>71</b>

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Fig. 1. Reclutamiento, selección y fase de dominancia en un patrón de crecimiento de 3 ondas durante un ciclo estral bovino _____</b>	<b>13</b>
<b>Fig. 2. Patrón de secreción de la FSH, la LH y la P4; y el patrón de crecimiento de los folículos ováricos durante el ciclo estral en el ganado _____</b>	<b>15</b>
<b>Fig. 3. Mecanismo de la retroalimentación del estradiol y de la progesterona _____</b>	<b>16</b>
<b>Fig. 4. Morfología del folículo de Graff _____</b>	<b>18</b>
<b>Fig. 5. Reanudación de los ciclos ováricos y de los folículos dominantes durante el período postparto en vacas lecheras y de carne amamantando nutricionalmente no estresadas _____</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 6. El papel de la prostaglandina F2<math>\alpha</math> en el control de la luteólisis _____</b>	<b>23</b>
<b>Fig. 7. TETF N/V2 Implante subcutáneo auricular _____</b>	<b>67</b>
<b>Fig. 8. TETF P0 con dispositivo intravaginal _____</b>	<b>68</b>
<b>Fig. 9. TETF P0/PMSG con dispositivo intravaginal _____</b>	<b>69</b>
<b>Fotografía 1. _____</b>	<b>72</b>
<b>Fotografía 2. _____</b>	<b>73</b>

## **1.- INTRODUCCIÓN**

**Es una realidad histórica el retraso tecnológico en el cinturón tropical del mundo entero, y México no es la excepción. La falta de infraestructura en las principales ciudades del sureste mexicano magnifica las carencias que se presentan en villas y poblados esparcidos a lo largo y ancho de ambas costas. Su crecimiento del producto interno bruto (PIB) primario es del 1.5% contra el 3.0% del resto del país y los estados tropicales presentan el menor nivel de competitividad (del Castillo. 2011).**

**Desde el punto de vista de la distribución de la pobreza a nivel nacional, la entidad con mayor incidencia de pobreza alimentaria es el estado de Chiapas, donde el 47% de la población se encuentra en esta situación. Le siguen los estados de Guerrero con 42%, Oaxaca con 38.1%, Tabasco con 28.5% y Veracruz con 28%. La situación de la pobreza de capacidades es prácticamente la misma que para la alimentaria. En primer lugar se encuentra Chiapas con 55.9%, le sigue el estado de Guerrero que reporta 50.2% y Oaxaca con 46.9%. De acuerdo con estas estimaciones, los estados con mayor pobreza de patrimonio son Chiapas, Guerrero y Oaxaca, con 75.7%, 70.2% y 68%, respectivamente. A nivel municipal, la mayor incidencia de pobreza se concentra en los municipios de los estados del sur y sureste del país (Plan Nacional de desarrollo. 2007-2012). En el Sur-Sureste se ubican 210 de los 300 municipios más marginados del país (del Castillo. 2011).**

**Esta desigualdad, expresada en la dimensión de la salud de las personas, puede observarse también entre regiones. Por ejemplo, en 2006 la tasa de mortalidad infantil en Guerrero fue cercana a 25 por cada mil niños nacidos. En 2005, el porcentaje de muertes en menores de cinco años causadas por enfermedades infecciosas fue de 24% en Chiapas (Plan Nacional de desarrollo 2007-2012). Asimismo, en México, cinco millones 393 mil 665 personas son analfabetas, lo que representa el siete por ciento del total de la**

población mayor de 15 años, las mayores tasas de falta de instrucción se registran en los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero, con el 16 al 17 por ciento. Esta condición, es más marcada entre las mujeres, pues del total, el 61 por ciento corresponde a este género (Canales. 2011).

Una de las causas de la desnutrición, reconocida por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) es la falta de acceso a los alimentos. La imposibilidad de acceder a ciertos productos básicos y complementarios, sobre todo en las localidades marginadas y de difícil acceso (Plan Nacional de desarrollo. 2007-2012), se asocia a la presencia de desnutrición y mala alimentación para cientos de miles de familias mexicanas que habitan en estos lugares (CONEVAL. 2009).

En México prácticamente toda la ganadería ha sufrido un retroceso a partir de las políticas restrictivas de 1982-1986 y continuadas en el siguiente sexenio, los datos del INEGI del censo de 1991 muestran la disminución del inventario de los rumiantes con mermas mayores al 40% en el total de los semovientes.

Esto se refleja en la disminución del consumo per cápita del mexicano de carne de res, de 40 kg en 1982 a 34.4 kg en 1992 (Galina y Guerrero. 1993).

El sector ganadero en México ha estado tradicionalmente dominado por los bovinos. En la actualidad la producción de carne, es la actividad más diseminada en el medio rural, pues se realiza sin excepción en todas las regiones ecológicas del país y aún en condiciones adversas de clima (SAGARPA. 2005). La producción de ganado bovino en México se desarrolla bajo diferentes contextos agroclimáticos, resumiéndose en tres principales regiones ecológico-ganaderas: norte, centro y sur (FAO-SAGARPA. 2001).

La ganadería en México se localiza en tres zonas ecológicas:

La primera en el norte árido y semiárido, con 27% del hato nacional (Galina y Guerrero. 1992), y 30% del hato cárnico nacional (SIAP. 2004) y con una tasa de crecimiento de 1960 a 1980 del 1.4% (Galina y Guerrero. 1992). Su producción se orienta principalmente a la ganadería de carne y la

exportación de becerros en pie, castrados y libres de brucelosis y tuberculosis hacia los E.U. (SAGARPA. 2005).

La segunda en el trópico húmedo y seco, con 42% de las cabezas del hato nacional (Galina y Guerrero. 1992) y 44% del hato cárnico nacional (SIAP. 2004); y con una tasa de crecimiento de 1960 a 1980 del 3% (Galina y Guerrero. 1992). La producción vacuna en el sur de México está más claramente dirigida hacia la carne que en el resto del país (Galina y Arthur. 1989). Es una zona natural proveedora de becerros para engorda y finalización en corrales, así como de carne en canal para abasto del DF y área metropolitana (Améndola. 2002).

La tercera zona templada-centro con 31% según Galina y Guerrero en 1992 y, 26% del hato nacional según el SIAP en 2004, y con una tasa de crecimiento de 1960 a 1980 del 2.5% (Galina y Guerrero. 1992). La producción de leche es el principal sistema, aunque en las últimas décadas esta región produjo el 27% de la carne vacuna nacional al engordar y finalizar becerros provenientes de las otras regiones (Améndola. 2002).

México tiene en su territorio un 25% de área clasificado como zona con clima tropical tanto seco como húmedo (INEGI. 1990). En estas zonas, la precipitación pluvial ejerce su efecto sobre el animal en forma indirecta: por un lado incide en la disponibilidad de alimento y por el otro influye en la humedad atmosférica que a su vez incide en el animal (Vélez *et al.*, 2002).

La fertilidad bovina es objeto de numerosas investigaciones en Ciencias animales, sobre todo porque la fertilidad de las vacas lecheras ha disminuido durante las últimas décadas (Boer *et al.*, 2011). Asimismo, una consecuencia no deseada de mayor tolerancia a las presiones ambientales ha producido una disminución en la productividad y la precocidad de vacas cebúes (Nogueira. 2004; Solano *et al.*, 2005). La regulación del celo es controlada por la compleja interacción de diversos órganos y hormonas. El comportamiento reproductivo del ganado bovino es distinto en las diferentes razas, en distintos climas y en distintos sistemas de explotación. El

parámetro reproductivo más importante es el Intervalo entre partos (IEP). Hafez and Jainudeen (1974) consideran que es de 13 meses. Nueve ranchos de doble propósito en el trópico seco promediaron 439 días (Esperón. 2000); estudios con ganado cebú en clima tropical reportan bajos índices reproductivos con porcentajes de gestación (PG) del 50% (Segura. 1987a). Brahman en el trópico tamaulipeco presentan un IEP de 481 días, (Martínez *et al.*, 2004); López *et al.*, 2004, reportan que un lote de ganado Simmental en explotación intensiva en Zacatecas, México, con clima seco, presenta un IEP promedio de  $16.30 \pm 3.9$  meses y tasa de parición de 62.19%, y concluyen que es factible mejorar los parámetros productivos y reproductivos de los hatos en los cuales la genética de estas razas pueda expresarse, siempre y cuando se tomen en cuenta las condiciones de clima, alimentación y un manejo adecuado.

En México, el 70% del total de bovinos que existen, se encuentran en zonas tropicales y subtropicales (Mosqueda *et al.*, 2004).

Uno de los obstáculos más importantes para los programas de mejoramiento de la ganadería nacional son las enfermedades que ocasionan grandes pérdidas en la introducción de bovinos genéticamente mejorados de alta productividad a zonas tropicales (Preciado *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2004). Estrategias como el uso de ganado resistente se basa en la habilidad genética de los animales *Bos indicus* de resistir las infestaciones por vectores y por ende de ser infectados. El resultado de su cruzamiento con *Bos taurus* no solo confiere mayor resistencia a los animales sino además logran una mayor producción de carne y leche (Mosqueda *et al.*, 2004). Por lo cual se han instituido programas de transferencia de tecnología que permitan la introducción de razas mejoradas en climas tropicales (Esperón. 1996 y 2000).

En los últimos años la transferencia embrionaria (TE) ha alcanzado procedimientos que permiten la utilización de métodos no quirúrgicos en bovinos, mantener los embriones por largo tiempo mediante su

congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido (Betteridge. 2003; Biggers. 1991; Galina y Valencia. 2006). La proliferación de individuos selectos sigue siendo la contribución directa principal de la transferencia de embriones a la producción pecuaria (Betteridge. 2003; Contreras *et al.*, 2008; Manual Merck. 1988; Sudano *et al.*, 2011).

La transferencia de embriones es una biotecnología que ha sido utilizada extensamente en todo el mundo para aumentar la producción de descendientes de hembras de la especie bovina (Barros *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2011). Thibier (2008), ha reportado que en todo el mundo fueron transferidos 823,160 embriones bovinos (obtenidos *in vivo* + fertilizados *in vitro*). Esto incluye 285,387 embriones que se transfirieron en Sudamérica, representando aproximadamente el 35% de la actividad global en el 2007. Actualmente la evaluación morfológica es la forma más práctica para determinar la calidad del embrión. Basándose en los porcentajes de gestación obtenidos por embrión, Noriega *et al.* (1995) y Aguilar *et al.* (2002) concluyen que la evaluación de embriones usando microscopio estereoscópico es muy subjetiva, porque casi 50% de embriones clasificados por esta técnica como de buena calidad, cuando son evaluados por microscopía de luz y electrónica son considerados células en estado degenerativo. Por lo que, cuando este tipo de embriones se transfieren disminuyen notablemente sus oportunidades de gestar (Galina and Arthur. 1989). El manejo óptimo de receptoras de embriones bovinos es esencial en el logro del éxito en un programa de transferencia embrionaria, una alta proporción de animales gestantes después de la TE será el mayor beneficio (Siqueira *et al.*, 2009).

Las receptoras juegan un papel crítico en el éxito de los programas de transferencia embrionaria (Bó *et al.*, 2004). Sin embargo, el alto costo de mantener a las receptoras (Baruselli *et al.*, 2010; Betteridge. 2003). Y la baja eficiencia de los programas tradicionales basados en prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) para la sincronización de estros en las receptoras, limita la

aplicación extensiva y exitosa de la tecnología de TE (Betteridge. 2003; Bó *et al.*, 2004; Nasser *et al.*, 2004). La detección de estros es particularmente difícil en ganado cebú debido a la corta duración del comportamiento estral y la alta incidencia de estros en la noche (Baruselli *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2010).

Variabilidad en la respuesta a protocolos de superovulación y el tiempo y el esfuerzo necesarios para administrar tratamientos han afectado la aplicación generalizada de transferencia embrionaria en programas de mejora genética. Aunque los esfuerzos de investigación en los últimos años no han aumentado el número de embriones transferibles por tratamiento (Hasler. 2003), protocolos que controlan el surgimiento de la onda folicular y el momento de la ovulación han permitido el tratamiento de los grupos de donadoras y receptoras, independientemente de la etapa del ciclo estral y permite la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) o la transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF) sin la necesidad de detectar estro. Esto ha tenido un impacto positivo en la TE comercial, porque ha facilitado la planificación de los protocolos de trabajo sin depender de los conocimientos y habilidades del personal para detectar estro (Bó *et al.*, 2010; Baruselli *et al.*, 2010).

No obstante, una mejora en la superovulación no podrá conducir necesariamente a un aumento en el número de embriones producidos por año. Sin embargo, podría aumentar la eficiencia, tanto para los propietarios del ganado de donadoras y receptoras, respectivamente, como del médico de TE (Hasler. 2003).

Las condiciones ambientales particulares del trópico húmedo. La fisiología reproductiva característica del ganado cebuino. El libre pastoreo en pastos nativos. El estrés por manejo excesivo. La impredecible respuesta del ganado a los protocolos hormonales. Más el desecho normal de vacas por muerte o reemplazo, limitan el desarrollo de esta tesis.

**La visita periódica a la explotación comercial por parte del grupo de asesores investigadores de la UNAM permitió la planeación y ejecución del trabajo de tesis de la Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia.**

**La capacitación que recibió el tesista en tres años de trabajo de campo: selección de donadoras; obtención, clasificación y congelación de embriones; selección, sincronización y transferencia de embriones de receptoras; mejora en la alimentación, adición de sales minerales, vitaminas y desparasitación son los alcances que reporta esta tesis.**

## 2.- REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1.- Historia de la Transferencia embrionaria.

Walter Heape realizó experimentos de transferencia de embriones en coneja entre 1890 y 1897 y los resultados fueron publicados en dos documentos en las actas de la Royal Society de Londres, la primera en noviembre de 1890 y la segunda en noviembre de 1897 (Betteridge. 2003; Biggers. 1991).

El primer experimento, Heape lo describe a continuación:

*“El 27 de abril de 1890, se obtuvieron dos embriones de una coneja Angora la cual había sido fertilizada por un conejo Angora treinta y dos horas antes, los embriones se habían segmentado en cuatro células. Estos embriones fueron trasladados inmediatamente en el extremo superior de la trompa de Falopio de una liebre belga hembra que había sido fertilizada tres horas antes por un macho de la misma raza. Cabe mencionar aquí, que compré esta liebre belga hembra unos tres meses antes; el hombre de quien le compré la cría y garantiza que sea una hembra Virgen de siete meses de edad. Durante el tiempo que la tenía hasta el 27 de abril, nunca había sido cubierta por un macho de raza alguna, siendo que siempre la mantuve aislada de los conejos en mi conejera. Oportunamente esta liebre belga hembra dio a luz a seis jóvenes, cuatro de ellos se parecían a ella misma y a su compañero, mientras que dos de ellos eran indudables Angora. Los jóvenes Angora se caracterizaron por la posesión del pelo sedoso largo peculiar a la raza y fueron verdaderos albinos, como sus padres de Angora”.* (Biggers. 1991).

Los detalles del procedimiento quirúrgico de Heape, que no figuran en su artículo de 1890, pero sí en el de 1897, son de interés, ya que la transferencia fue hecha sin colocar los embriones en un ambiente extraño, tal como, suero o solución salina durante el proceso de transferencia.

La técnica se describe a continuación: *“la liebre belga hembra es puesta bajo anestesia y tendida sobre su estómago. Luego se hace una incisión longitudinal, 2 cm de largo, a través de la piel en un lugar 1-5 a 3-5 cm desde*

*el extremo anterior de la pelvis y en un nivel con el borde ventral de la musculatura lumbar. Una pequeña incisión se realiza, a continuación, a través de la pared corporal sólo ventral a la musculatura lumbar, y el extremo anterior de la trompa de Falopio es encontrado fácilmente y sacado a través de la apertura con la ayuda de un par de pinzas.*

*Los embriones extranjeros son luego sacados de las trompas de Falopio materna en la punta de una aguja cabeza de lanza; el infundíbulo de la madre adoptiva se mantiene abierto con un par de pinzas y los embriones son colocados bien adentro del extremo anterior de su trompa de Falopio; Después de empujar el último suavemente y lavado con alguna solución antiséptica, la herida es cosida y cubierta con colodión y algodón hidrófilo” (Biggers. 1991; Hasler. 2003).*

La primer transferencia de un embrión bovino fue reportado en 1949 y el nacimiento del primer becerro por TE en 1951 logrado por Willett *et al* (Hafez. 1996; Seidel and Seidel. 1991). Fue, en parte, la disponibilidad de instalaciones quirúrgicas y de expertos en Cambridge que provocó cambios curiosos y contracambios en los métodos de obtención de embriones de bovinos. Métodos quirúrgicos para la recuperación de embriones se desarrollaron primero en perros para su aplicación en seres humanos y fueron utilizados en los primeros trabajos con ovejas y cabras y en algunos de los trabajos en el ganado bovino texano (Hasler. 2003). Sin embargo, otros trabajos iniciales de recuperación de embriones en el ganado vacuno, en ambos lados del Atlántico, así como en Japón, a menudo involucran métodos transcervicales: el primer informe de un ternero nacido de transferencia de embriones no quirúrgico fue en 1964. En Japón (1965) Sugie citado por Betteridge (2003), también logró éxito con un método transvaginal, pasando el cuello uterino, en conjunción con insuflación de CO<sub>2</sub> para asegurarse de que la aguja utilizada para depositar el embrión estuviera en el lumen uterino. El trabajo de Sugie en Japón, llevó en 1966 a Rowson y Moor citados por Betteridge (2003), a utilizar insuflación de CO<sub>2</sub>

del útero después de la transferencia transcervical, en la creencia de que esto impide la expulsión del embrión.

A pesar de algunos éxitos, sin embargo, el enfoque transcervical temporalmente cayó en desuso a favor de los resultados ampliamente superiores mediante el uso de la cirugía en Cambridge a finales de la década de 1960. No fue sino hasta mediados de los 70 que los métodos transcervicales fueron “redescubiertos” para la recuperación y transferencia de embriones y reemplazaron completamente los métodos quirúrgicos (Betteridge. 2003; Hasler. 2003).

La detonación de la TE fue por la coincidencia de dos eventos muy distintos (Hasler. 2003). La primera de ellas fue la publicación en 1969 de los excelentes resultados obtenidos en ganado por Rowson. Compararon dos métodos de transferencia (quirúrgica y no quirúrgica) y dos medios (suero homólogo y TCM 199). Polge en 2000 citado por Betteridge (2003), cita: *"suero homólogo había sido utilizado en todos los experimentos anteriores sobre la transferencia de embriones en ganado y fue utilizado habitualmente en ovejas, con buen éxito. TCM 199 fue elegido como un medio alternativo simplemente porque estaba disponible en el laboratorio en ese momento. Los resultados fueron claros y dramáticos. Ningún embarazo se obtuvo tras transferencia quirúrgica o no quirúrgica de embriones en suero. Por el contrario, con TCM 199 pocas transferencias exitosas se obtuvieron no quirúrgicamente, pero con métodos quirúrgicos para la recolección y transferencia de embriones la tasa de embarazo fue del 91%"*.

El segundo evento, con la que coincidió la publicación anterior, fue una decisión del gobierno canadiense para importar las razas europeas de carne denominadas “exóticas”. Sin embargo, la importación incluye muy estrictos y costosos procedimientos de pruebas y cuarentena para impedir la importación concomitante de enfermedades, en particular Fiebre Aftosa. Había una demanda de estas razas “nuevas” debido a su desempeño superior en comparación con las razas británicas que pueblan al país, el

oeste en particular. La demanda se extendió a los Estados Unidos, donde los productores podrían importar ganado de Canadá pero no directamente desde Europa. La venta de razas “exóticas” fue muy limitada debido a que tenían que celebrarse en las estaciones de cuarentena especialmente construidas en las islas francesas de Saint Pierre y Miquelon en el Golfo de San Lorenzo, Québec y Grosselle. En consecuencia, el precio de animales importados fue inflado y el incentivo para obtener descendencia de ellas correspondientemente alto: una llamada a la medida para la aplicación de superovulación y transferencia de embriones. La llamada fue contestada por veterinarios y sus partidarios que se aprestan a aprender las técnicas y aplicarlas en las empresas comerciales. La mayoría de aspirantes a transferidores viajó a Cambridge para aprender de Rowson y sus colegas, pero unos pocos, convencidos de la necesidad de los métodos transcervicales, cruzaron el Océano Pacífico para aprender de Sugie en Japón (Betteridge. 2003).

Otro avance importante fue la llegada de la utilización de prostaglandina F<sub>2α</sub> y sus análogos para sincronizar el celo en animales de granja. Lo difícil es pensar en volver a los tiempos cuando se dependía de receptoras ciclando naturalmente, lo cual requería el mantenimiento costoso de hatos muy grandes (Betteridge. 2006).

## **2.2.- Dinámica folicular del ciclo estral bovino.**

**El ciclo estral representa el patrón cíclico de actividad ovárica que facilita a las hembras pasar de un periodo reproductivo de no-receptividad a uno de receptividad, lo que permite el apareamiento y embarazo. La duración normal de un ciclo estral en el ganado bovino es de 18-24 días. El ciclo consta de dos fases: la fase lútea (14 a 18 días) y la fase folicular (6 días). La fase lútea es el periodo siguiente a la ovulación cuando se forma el CL (metaestro y diestro), mientras que la fase folicular es el período posterior a la desaparición del cuerpo lúteo (luteólisis) hasta la ovulación (proestro y estro). Durante la fase folicular, la maduración final y la ovulación del folículo dominante ocurre, el ovocito es liberado en el oviducto para su potencial fertilización. Las vacas son animales poliéstricos y manifiestan comportamiento estral aproximadamente cada 21 días (Forde *et al.*, 2011).**

### 2.2.1.- Crecimiento folicular en ondas

No fue sino hasta el descubrimiento de que el crecimiento de los folículos en el bovino se produce en distintos patrones parecidos a ondas (ver Fig. 1.), utilizando ultrasonografía de tiempo real (Aerts y Bols. 2010b; Bó *et al.*, 1995; Bridges y Fortune. 2003; Diskin *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2005; Sartori y Barros. 2011), que los científicos fueron capaces de embarcarse en protocolos de sincronización de celos y ovulaciones (Bó. 2002; Bó *et al.*, 2010; Jones y Lamb. 2008). El ciclo estral bovino comprenderá normalmente una o dos olas no ovulatorias y una ola ovulatoria (Aerts y Bols. 2010b; Macmillan *et al.*, 2003). La mayoría de hembras bovinas *Bos taurus* y *Bos indicus* tienen dos o tres ondas foliculares y raramente una o cuatro (Barros y Nogueira. 2001).

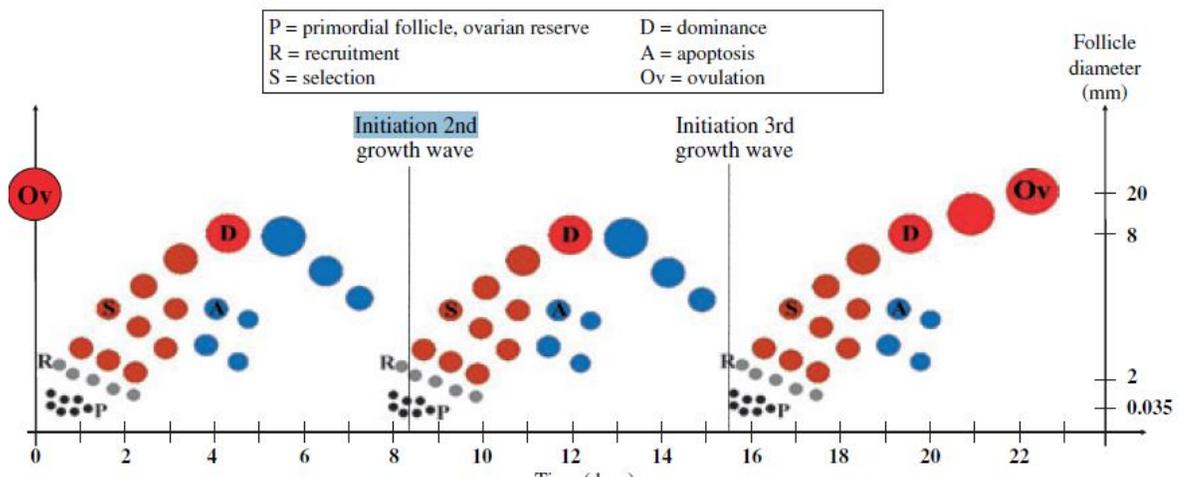


Fig. 1. Reclutamiento, selección y fase de dominancia en un patrón de crecimiento de 3 ondas durante un ciclo estral bovino (Aerts y Bols. 2010b).

Una onda de crecimiento folicular implica el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios (Barros y Nogueira. 2001; Bó *et al.*, 1995; Bó. 2002; Bridges y Fortune. 2003; Dean y Dailey. 2011; Ginther *et al.*, 1998). Al comienzo de cada onda folicular, 24 pequeños folículos antrales (Aerts y Bols. 2010b) de aproximadamente 3–5 mm se han

detectado en el ganado *B. taurus*; mientras que en ganado *B. indicus*, un mayor número de folículos pequeños ha sido registrado durante la aparición de la primera ola folicular, por ejemplo, 39 pequeños folículos en vacas Brahman y hasta 50 pequeños folículos en los ovarios de novillas Nelore (Barros y Nogueira. 2001; Sartori y Barros. 2011). Durante aproximadamente 2 o 3 días todos los folículos crecen, uno de ellos se selecciona y continúa creciendo hasta convertirse en folículo dominante de 7-8 mm (Aerts y Bols. 2010a; Binelli y Murphy. 2010; Bó *et al.*, 1995; Bridges y Fortune. 2003; Dean y Dailey. 2011; Forde *et al.*, 2011), mientras que el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y regresan (Bó *et al.*, 1995; Bó. 2002; Sartori and Barros. 2011). La primera onda de desarrollo folicular (ver fig. 2) se detecta el día de la ovulación (Día 0) en los ciclos de 2 o 3 ondas. La segunda onda comenzará el día 9 o 10 para los ciclos de 2 ondas y uno o dos días más temprano (día 8 o 9) en los ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas la tercera onda emerge en el día 15 o 16 (Aerts y Bols. 2010a; Bó *et al.*, 1995). Estos patrones son valores promedio ya que existe una gran variabilidad individual, especialmente en la segunda onda que puede comenzar a emerger entre los días 6 a 12 en distintos animales (Bó. 2002). La cantidad de ondas determina la duración del ciclo estral, ya que el CL inicia su regresión más temprano en los ciclos de 2 ondas (día 16), que en los de 3 ondas (día 19). Así, la duración del ciclo de 2 ondas es de 18 a 20 días (Bó. 2002; Sartori y Barros. 2011) y de 21 a 23 días en el de 3 ondas (Aerts and Bols. 2010b; Bó. 2002; Sartori y Barros. 2011). Algunos animales *Bos indicus* pueden tener ciclos con 4 ondas, la cuarta onda comienza el día 20 o 21 y el ciclo estral dura 24 o 25 días (Bó. 2002; Sartori y Barros. 2011).

En vacas Holstein se detectó la emergencia de la primera onda folicular entre 2 y 7 d (media de 4 d) después del parto y la primera ovulación ocurrió, en promedio en el Día 27 (rango, 12 a 58). En 17/18 (94%) vacas posparto la primera ovulación no estuvo acompañada por comportamiento estral. El

primer estro tiene una media de 59 d (rango, 17-139 d). La longitud del periodo interovulatorio depende del momento de la primera ovulación. La diferencia fundamental en la dinámica folicular durante el posparto en vacas de carne con respecto a las de leche radica en el efecto de la presencia del ternero sobre la secreción hormonal (Bó. 2002). En vacas que amamantan un ternero, la primera ovulación (media 30.6 d) ocurre más tarde que en vacas lecheras y el folículo dominante de la primera onda folicular posparto raramente ovula (11%).

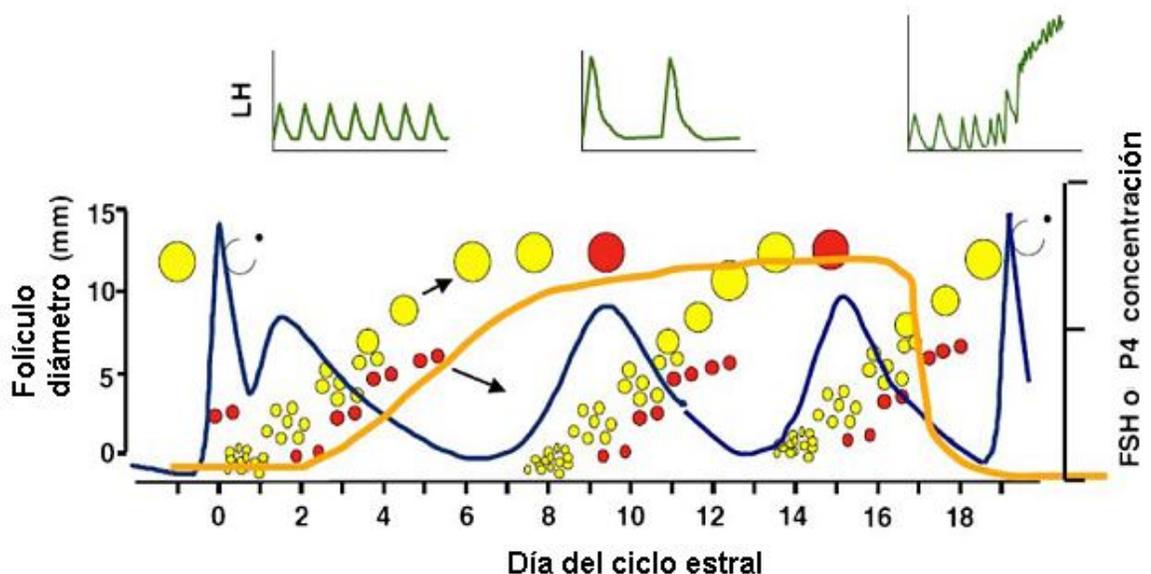


Figura 2. Representación esquemática del patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la progesterona (P4); y el patrón de crecimiento de los folículos ováricos durante el ciclo estral en el ganado. Cada ola de crecimiento folicular es precedida por un aumento transitorio de las concentraciones de FSH. Folículos crecientes saludables están sombreados en amarillo, folículos atrésicos están sombreados en rojo. Un aumento en las concentraciones de LH y FSH se produce al comienzo del ciclo estral e induce la ovulación. El patrón de secreción de pulsos de LH durante una ventana de 8 h al inicio de las fases: lútea (mayor frecuencia, menor amplitud), media lútea (menor frecuencia, menor amplitud) y la fase folicular (alta frecuencia, conformando la oleada) se indica en las inserciones en el panel superior (Forde *et al.*, 2011).

En la mayoría de las vacas (78%), la ovulación ocurre a partir de la segunda, tercera, cuarta o quinta onda folicular posparto y, como en las vacas lecheras, si la primera ovulación ocurre después del día 20 es seguida por un ciclo corto. Si bien el destete resulta en un incremento medible en las concentraciones circulantes de LH y adelanto del estro, generalmente es seguido de una fase lútea de corta duración (Bó. 2002).

### 2.2.2.- Endocrinología y desarrollo folicular

El mecanismo que regula la dinámica folicular está basado en respuestas diferenciales de los folículos a la FSH y LH, ver Fig. 2. Se ha demostrado que hay incrementos de la concentración de FSH que comienzan 2 d antes de la emergencia de una onda folicular (Bó *et al.*, 1995) y llegan al pico máximo 1 d antes o el día de comienzo de cada onda.

Alrededor del momento del celo hay dos picos de FSH que son muy difíciles de diferenciar porque están muy cercanos entre sí. El primer pico de FSH es inducido por la liberación de GnRH desde el hipotálamo y ocurre al mismo tiempo que el pico preovulatorio de LH (Bó. 2002). El folículo preovulatorio alcanza un gran tamaño y produce grandes cantidades de estradiol, en algún momento, el estradiol circulante alcanza una concentración y duración suficiente para inducir estro conductual y la inducción de una oleada de LH preovulatoria (Forde *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2009; Sartori y Barros. 2011), vía una oleada de GnRH desde el hipotálamo (Forde *et al.*, 2011) ver Fig. 3. El segundo pico de FSH ocurre cerca del momento de la ovulación (24–32 h más tarde) y es aparentemente el responsable del reclutamiento de los folículos de la primera onda folicular (Bó. 2002).

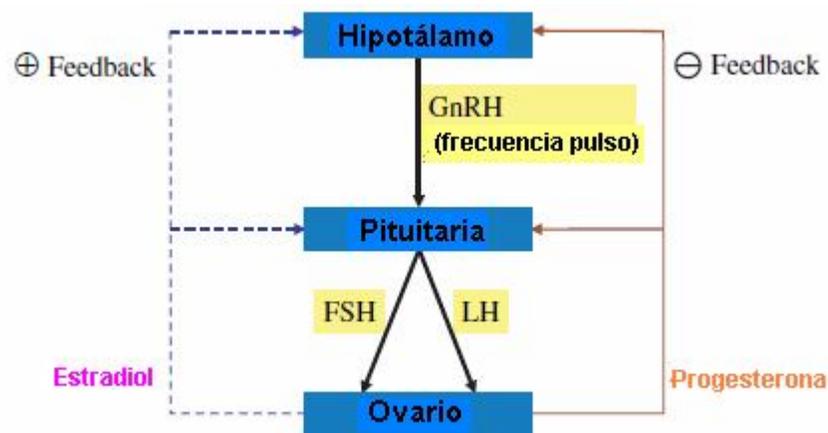
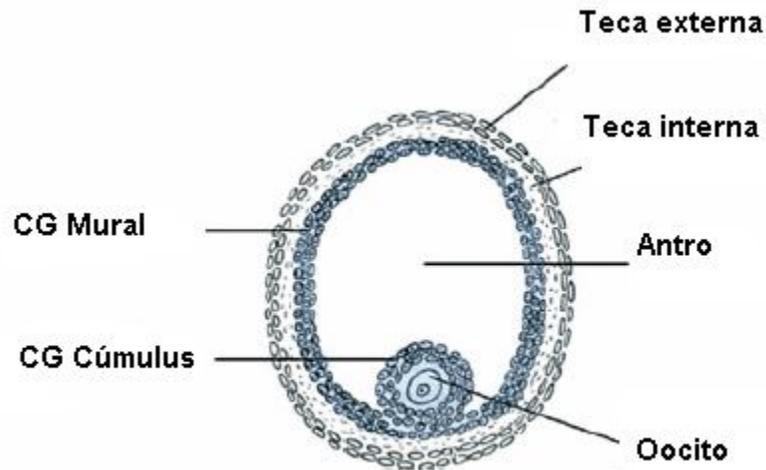


Fig. 3. Mecanismo de la retroalimentación del estradiol y de la progesterona. A una concentración en plasma arriba del nivel umbral, el estradiol aumenta la frecuencia del pulso de GnRH a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, y causa una secreción elevada de la LH. La progesterona ejecuta un efecto de retroalimentación negativa sobre la frecuencia del pulso, por lo tanto, la oleada de la LH está ausente en presencia de un CL funcional (Aerts and Bols. 2010b).

El mecanismo de selección del folículo dominante no se ha aclarado completamente (Aerts y Bols. 2010b; Barros *et al.*, 2010; Bó. 2002; Diskin *et al.*, 2003; Ginther *et al.*, 1998; Sartori y Barros. 2011). Al momento que el crecimiento del folículo dominante y de los subordinados comienza a diferenciarse (deviation) la FSH declina rápidamente, llegando a los niveles más bajos alrededor del Día 2.5 cuando el folículo dominante alcanza 8.5 a 9.0 mm en razas europeas, mientras que en la raza Nelore el folículo dominante alcanza 5 a 6 mm (Aerts y Bols. 2010b; Bó. 2002; Diskin *et al.*, 2005; Forde *et al.*, 2011; Ginther *et al.*, 1998; Sartori y Barros. 2011; Simoes *et al.*, 2011). En este momento los niveles de FSH se encuentran por debajo de los niveles necesarios para el crecimiento de los folículos subordinados que se atresian, mientras el folículo dominante adquiere la capacidad de seguir creciendo con bajos niveles de FSH (Aerts y Bols. 2010a; Bó. 2002; Simoes *et al.*, 2011). La disminución de FSH es producida por la Inhibina, que es aparentemente secretada por todos los folículos subordinados, y el estradiol 17- $\beta$  que es producido principalmente por el folículo dominante (Aerts y Bols. 2010b; Bó. 2002; Diskin *et al.*, 2005; Forde *et al.*, 2011; Ginther *et al.*, 1998; Sartori y Barros. 2011).

La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH, mientras que los subordinados se atresian puede estar relacionada con la síntesis de receptores para LH (LHR) en las células de la granulosa del folículo dominante (ver Fig. 4). Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y receptores FSH en las células de la granulosa pero solo el folículo dominante adquiere receptores LH en las células de la granulosa (Barros *et al.*, 2010; Diskin *et al.*, 2003; Forde *et al.*, 2011; Sartori y Barros. 2011; Simoes *et al.*, 2011). Los receptores de LH aumentan abruptamente a partir del Día 4 de la onda, cuando el folículo dominante tiene más de 8 mm de diámetro (Aerts y Bols. 2010b). La LH se unirá a los receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de estradiol que le permitirá al folículo seguir creciendo aunque disminuyan

los niveles de FSH circulante. Por esta razón se dice que el folículo dominante > 8 mm es LH dependiente (Aerts y Bols. 2010a; Bó. 2002; Bó *et al.*, 2010; Dean y Dailey. 2011; Diskin *et al.*, 2005; Forde *et al.*, 2011; Jones y Lamb. 2008).



CG: células de la granulosa

Fig. 4. Morfología de un folículo de Graff (Aerts y Bols 2010a).

La relación entre los niveles de LH y el crecimiento folicular también puede explicar el fenómeno de regresión del folículo dominante de las ondas foliculares anovulatorias y el comienzo de la próxima onda folicular. Los altos niveles circulantes de P4 producidos por el CL (Sartori y Barros. 2011), disminuyen la frecuencia de los pulsos de LH y causan la detención de las funciones metabólicas del folículo dominante. Este cese de la secreción de estradiol-17 $\beta$  e inhibina se produce antes de que se observe una disminución del diámetro del folículo dominante, pero tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH que va a reclutar los folículos de la siguiente onda folicular. Por el contrario, al ocurrir la luteólisis hacia el final del ciclo, entre los días 16-19 para *Bos taurus* y *Bos indicus* (Sartori y Barros. 2011), hay un incremento de la frecuencia de los pulsos de LH que estimula el crecimiento del folículo dominante y una mayor

producción de estradiol-17 $\beta$ , que induce los signos de celo y el pico preovulatorio de LH. Además de los factores endócrinos descritos, también se han estudiado factores intragonadales (Aerts y Bols. 2010a; Binelli y Murphy. 2010; Bó *et al.*, 2010; Jones y Lamb. 2008; Padmanabhan y Sharma. 2001; Martin *et al.*, 2008) que intervienen en el control autócrino y parácrino de la función ovárica. En general, se piensa que estos factores intraováricos modulan el número y desarrollo de los folículos en crecimiento, principalmente a través de la regulación de las gonadotropinas o de la respuesta de las gonadotropinas. Sin embargo, los efectos supresivos del folículo dominante sobre los subordinados se ejercen aparentemente a través de canales sistémicos más que autócrinos y parácrinos.

### 2.2.3.- Desarrollo folicular en el posparto (PP).

El desarrollo folicular en ondas se continúa después del parto y hay un gran aumento de FSH que reclutará los folículos de la primera onda folicular. Sin embargo, hay una inadecuada frecuencia de pulsos de LH que afecta el crecimiento final del folículo dominante y su ovulación. Cuando los pulsos de LH aumentan a aproximadamente un pulso cada 40-60 minutos se estimula el crecimiento final del folículo dominante a los 7 a 10 días (Forde *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2008) y hay una máxima producción de estradiol-17 $\beta$  que, por retroalimentación positiva sobre el hipotálamo, desencadena el pico preovulatorio de LH y FSH y la primera ovulación entre los 15 y 45 días PP y muestran ciclos regulares a intervalos de 18-24 días en vacas lecheras, mientras que vacas de carne amamantando becerros típicamente no reasumen la ovulación hasta los 30-130 días (ver Fig. 5; Bó 2002; Forde *et al.*, 2011).

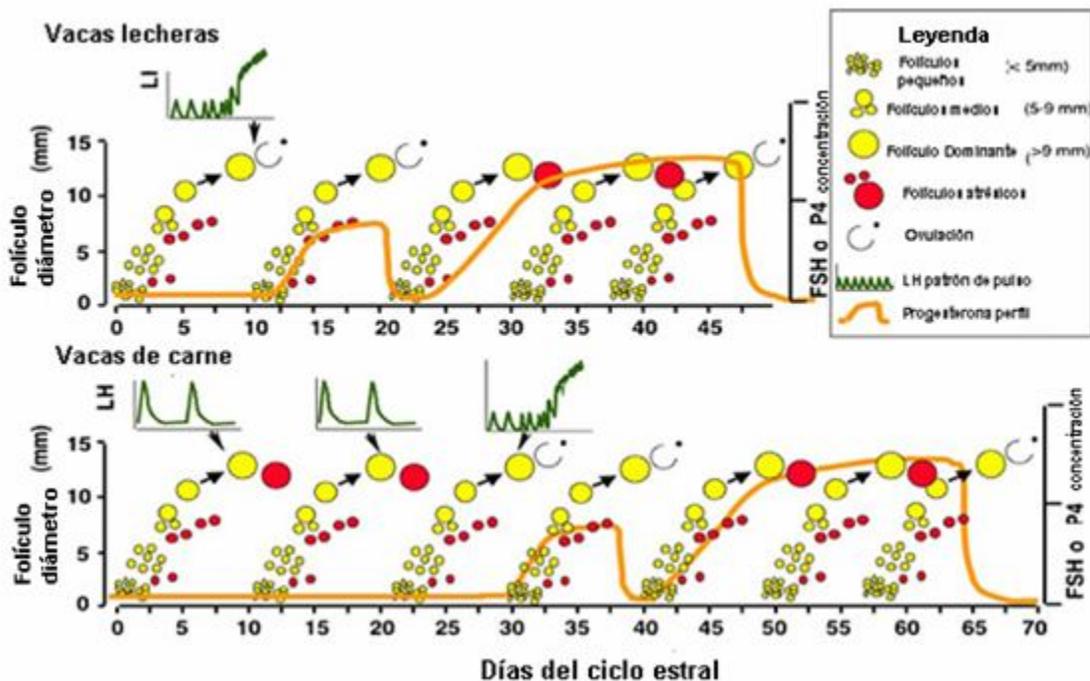


Figura 5. Representación esquemática de la reanudación de los ciclos ováricos y de los folículos dominantes durante el período postparto en vacas lecheras y de carne amamantando nutricionalmente no estresadas. Frecuencia del pulso de LH que ocurre durante una ventana de 8 h cuando las vacas son sangradas cada 15 minutos. Ciclos estrales cortos no siempre ocurren después de la primera ovulación (Crowe 2008; Forde *et al.* 2011).

#### **2.2.4.- Desarrollo folicular en el periodo prepúber.**

La aparición de la pubertad se caracteriza por la primera ovulación, que se produce entre 6 y 24 meses de edad dependiendo de factores genéticos y ambientales. La maduración sexual de novillas implica un aumento en la circunferencia del ovario con la edad que es más pronunciado alrededor de los 13 meses de edad. La Pubertad en Cebú sudamericano se alcanza a los 22–36 meses y la edad al primer parto es de alrededor de 44–48 meses de edad. Esta es una preocupación importante para los ganaderos e investigadores, y están trabajando para lograr una reducción en la edad de la pubertad y primer parto a fin de aumentar la productividad de ganado Cebú (Nogueira. 2004).

La maduración sexual de novillas Cebú involucra un aumento en la secreción de LH mientras la secreción de FSH no ha cambiado y estos cambios en la secreción de gonadotropina fueron similares a los reportados para el ganado *Bos taurus*. La disminución progresiva de la respuesta hipotalámica al estradiol permitió un aumento en la estimulación pituitaria, que se reflejó en mayores niveles de secreción de LH. Las novillas precoces tienen folículos con un mayor diámetro a los 12 y 14 meses de edad que los animales no precoces, no hubo ninguna diferencia en la secreción de LH sugiriendo que novillas precoces responden mejor a bajas concentraciones plasmáticas de LH. Factores que determinan cuándo comenzará en una vaquilla el ciclo estral son la edad y la grasa corporal dado que el hipotálamo está programado vía la secreción de leptina por el adipocito.

Aunque las novillas Cebú alcanzan la madurez en una edad avanzada y a una mayor proporción del peso maduro, tienen una mayor longevidad reproductiva en comparación con *Bos taurus* (Nogueira. 2004).

### **2.2.5.- Función del cuerpo lúteo durante el ciclo estral**

**El CL se origina de las células del folículo ovulatorio. La LH, la principal hormona luteotrópica en el ganado vacuno, es la responsable de estimular la luteinización de las células de la teca y la granulosa del folículo pre-ovulatorio (Aerts y Bols. 2010b; Forde *et al.*, 2011) en células lúteas. La función del CL es producir concentraciones suficientes de progesterona durante la fase lútea del ciclo estral para mantener el embarazo (si está presente un embrión) y durante el embarazo, para disminuir la secreción de gonadotropina y prevenir la ocurrencia del estro conductual. Por otra parte, el aumento sostenido de concentraciones de progesterona durante la fase lútea del ciclo estral modifica el patrón de expresión de los genes en el útero (Forde *et al.*, 2011). Durante la fase lútea media, estas altas concentraciones sostenidas de progesterona circulante regulan el receptor nuclear de progesterona en el epitelio luminal del endometrio. Este es un “detonador” crítico al permitir el aumento o disminución sincronizado en los genes del endometrio que se requieren para iniciar la receptividad uterina, independientemente de la situación de preñez del animal. Si, por el día 16 del ciclo estral el reconocimiento materno de señal de preñez (interferón tau) no ha sido detectado en cantidades suficientes, se produce luteólisis del CL. La PGF2 $\alpha$  es secretada por el útero. Receptores de oxitocina en el útero se unen a la oxitocina que propaga la secreción episódica de PGF del útero. La PGF2 $\alpha$  regula, a continuación, el mecanismo luteolítico a través del intercambio contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica (ver Fig. 6), induciendo regresión del CL. Esto reduce las concentraciones circulantes de progesterona, aumentan las concentraciones de estradiol y el GnRH en el hipotálamo es estimulado mientras el animal entra en la fase folicular del ciclo estral (Forde *et al.*, 2011; Hafez. 1996).**

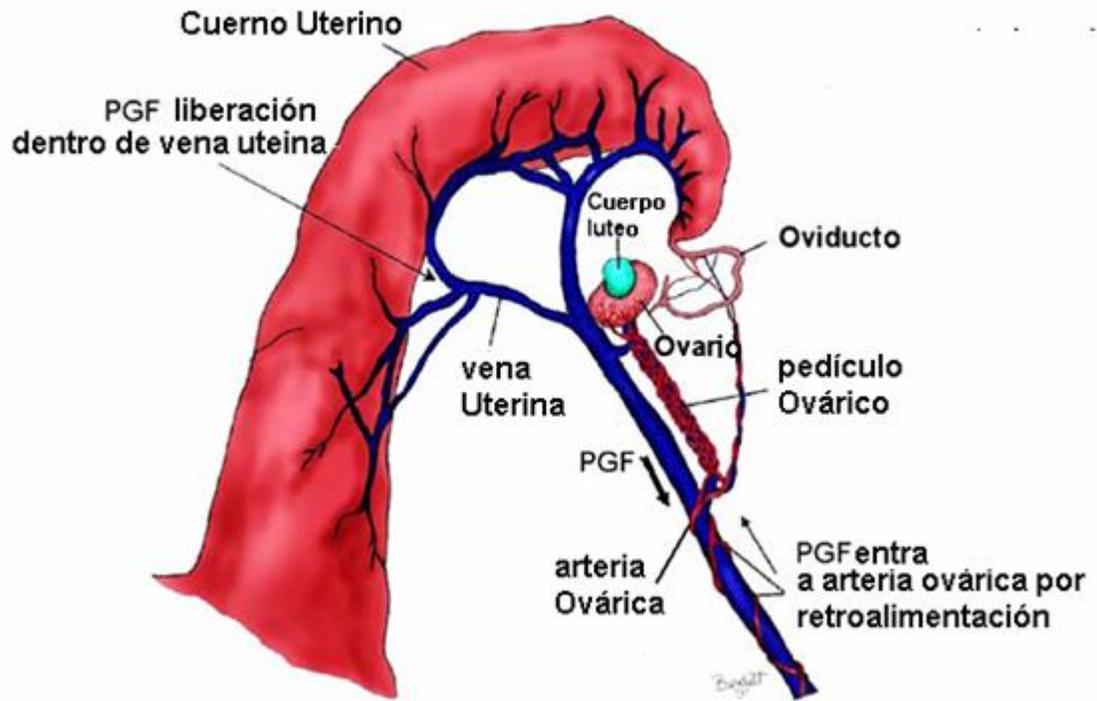


Figura 6. El papel de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en el control de la luteólisis. La prostaglandina liberada desde el endometrio uterino dentro de la vena uterina se transfiere a la arteria ovárica mediante intercambio contracorriente y esta retroalimenta al CL como un mecanismo local donde provoca luteólisis (Forde *et al.*, 2011).

### **2.3.- Mecanismos del control hormonal de los protocolos de transferencia embrionaria a tiempo fijo.**

Un ejemplo de un sistema biológico dinámico es el ciclo estral bovino, períodos recurrentes controlados hormonalmente cuando la vaca está preparándose para la reproducción, produciendo un ovocito fertilizable. Coincidiendo con la selección para mayor rendimiento lechero, una disminución en la fertilidad de la vaca lechera se ha observado durante las últimas décadas. Esta disminución de fertilidad se muestra mediante, por ejemplo, alteraciones en los patrones de las hormonas durante el ciclo estral, expresión reducida de comportamiento de celo y bajas tasas de concepción. Sin embargo, es difícil de comprender los mecanismos subyacentes que causan esta disminución en la fertilidad. La regulación del celo es controlado por la interacción de diversos órganos y hormonas (Boer *et al.*, 2011).

Por lo cual, se han implementado protocolos de superovulación e inseminación artificial en vacas donadoras y protocolos de transferencia embrionaria a tiempo fijo en vacas receptoras, que establecen un patrón hormonal característico según el protocolo empleado.

#### **Mecanismos del control hormonal en donadoras**

Revisaremos los efectos que promueven en las donadoras algunos de los protocolos, la fase del ciclo estral en la que se inicia, el tiempo de aplicación y/o retiro y las vías de administración.

##### **1. Progestágenos y Estrógenos**

Se ha demostrado que el uso de la progesterona (P4) en asociación con la administración de estradiol (E2), reduce la secreción de gonadotropinas circulantes por un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis (Bó. 2002; Monteiro *et al.*, 2009) y, promueven atresia folicular e inducen la aparición de una nueva ola folicular, aproximadamente 4 días después del tratamiento (Barros. 2010; Bó *et al.*, 1995; Monteiro *et al.*, 2009). El estradiol inyectable también induce regresión lútea (Bó *et al.*, 2002).

**a) Dispositivo Intravaginal de Liberación Prolongada (CIDER) y estradiol (E2).**

Es el protocolo más utilizado en la sincronización con Progestágenos para sincronizar el desarrollo folicular, en el día 0 se administran 2 mg de benzoato de estradiol (BE) por vía i.m. en el momento de la inserción del dispositivo intravaginal de liberación prolongada con 1.9 g de P4 (Barros *et al.*, 2010). En el día 7 se retira el dispositivo intravaginal.

**b) Norgestomet (N)**

La porción inyectable de N, tiene el propósito de: a) provocar luteólisis, junto con el valerato de estradiol (VE) y, b) alcanzar altos niveles circulantes de P4, que serían mantenidos por la liberación lenta del implante subcutáneo, la porción restante de N; también induce, a través de la supresión de los folículos presentes, el desarrollo de una nueva onda folicular 3 a 8 días después. 3 mg de N en implante auricular y 3 mg de N + 5 mg de VE i.m. (Bó. 2002).

Un implante que contiene 3 mg de norgestomet en novillas maduras sin un CL resulta en una frecuencia pulsátil de LH típica para la fase folicular (aproximadamente 1 pulso/h). Sin embargo, dos o cuatro implantes de norgestomet suprimen la frecuencia de pulso de LH de la fase lútea, y apoyan la afirmación de que las concentraciones de progesterona circulante modulan las concentraciones de LH y su pulsatilidad y, a su vez, el crecimiento del folículo ovulatorio (Sudano *et al.*, 2011).

**2. Estrógenos**

Una vez que se metaboliza el estradiol, una ola de FSH en la circulación y una nueva onda folicular emergen (Bó *et al.*, 2002). En algunos países se ha prohibido su uso por ser hormona controlada (Bó *et al.*, 2010).

**a) Valerato de estradiol (VE)**

Hay un efecto luteolítico del valerato de estradiol al administrarlo en el día de inserción de los implantes. 5 mg VE + 3 mg de N i.m. el día 0. Induce la

ovulación aplicado 24 h después de retirar el implante (Bó. 2002; Lopes da Costa *et al.*, 2001).

**b) Benzoato de estradiol (BE)**

Se utiliza para la sincronización de la onda folicular y sincronización de la ovulación. La idea es inducir un pico preovulatorio de LH a través de la retroalimentación positiva del estradiol a la GnRH (Bó 2002; Forde *et al.*, 2011). En el día 8 se aplica 1 mg de BE i.m. para sincronizar la ovulación (Bó 2002). El día 10 se toma como el día del celo. La mayoría de los animales ovulan en promedio a las 66 horas (día 11). Se realiza la TETF el día 17.

**c) Cipionato de estradiol (CE)**

El Cipionato se utiliza para sincronizar la ovulación. Se aplican 0.5 mg de CE i.m. 24 h después de retirar el CIDER (Bó. 2002).

**3. Hormona Folículo Estimulante (FSH)**

El ganado Cebú puede requerir menos FSH que *Bos taurus* para lograr una óptima respuesta superovulatoria (Barros y Nogueira. 2001).

**4. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)**

La eCG estimula el crecimiento folicular final, posiblemente debido a la presencia de LHR en folículos > 7 mm de diámetro, dando como resultado un mayor número de folículos capaces de ovulación en respuesta a la LH exógena (Bó *et al.*, 1995). Aunque la eCG aumenta también el número total de embriones (Barros *et al.*, 2010).

**5. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)**

En algunos países se ha prohibido su uso por ser hormona controlada (Jones and Lamb. 2008). La eficacia de la GnRH para inducir regresión folicular es dependiente, en parte, del día del ciclo estral cuando la GnRH es administrada (Bridges *et al.*, 2010). Causa ovulación o luteinización de los folículos grandes presentes al momento del tratamiento (Bó. *et al.* 1995; Bó *et al.*, 2002).

**6. Hormona Luteinizante (LH)**

a) **Hormona Luteinizante (LH) + Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).**

b) **Hormona Luteinizante (LH) y Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).**

Porque las isoformas LHR carecen del exón 10 pueden ser activados por hCG pero no por LH, se trató de mejorar la respuesta ovulatoria y la producción de embriones de un protocolo superestimulador mediante la combinación de estos dos ligandos (Barros *et al.*, 2010).

**Mecanismos del control hormonal en receptoras**

Revisaremos los efectos que promueven en las receptoras algunos de los protocolos, la fase del ciclo estral en la que se inicia, el tiempo de aplicación y/o retiro y las vías de administración.

#### **1. Progestágenos y Estrógenos**

La administración de progestágenos exógenos es más práctico y ofrece más ventajas sobre otros tratamientos para acortar la aciclicidad posparto en vacas de carne amamantando (Yavas y Walton. 2000).

##### **a) Dispositivo Intravaginal de Liberación Prolongada (CIDER)**

Imita un ciclo corto 3 semanas después del parto, al mantener la progesterona circulante en concentraciones subluteales o circulando progesterona en concentraciones intermedias, extiende la vida útil y permite terminar la maduración del folículo dominante posparto como en vacas cíclicas, por inicio de pulsos de GnRH y LH endógenos. Esto es seguido por una oleada de LH, ovulación y ciclos normales (Bó. 2002; Yavas y Walton. 2000). El beneficio de utilizar progestágenos exógenos después de 3 semanas del parto en vacas de carne amamantando es que la ovulación es inducida, se inicia la ciclicidad, el CL resultante tiene una vida y función normal y no es necesario cambiar el manejo, tal como el destete de los terneros (Yavas y Walton. 2000). Inserción del dispositivo intravaginal de liberación prolongada con 1.9 g de P4 (Barros *et al.*, 2010) en la tercera

semana posparto. En los días 7 a 14 se retira el dispositivo intravaginal (Barros *et al.*, 2010; Bó. 2002).

**b) Norgestomet (N)**

El implante auricular de norgestomet es elegido para minimizar los efectos supresivos de P4 en el crecimiento folicular en vacas *B. indicus* (Torres-Júnior *et al.*, 2005).

Las receptoras reciben en el día 0, un implante auricular de 3 mg de N de liberación prolongada y 3 mg de N + 5 mg de VE i.m.; PGF2 $\alpha$  se da en el día 5 (1 día después de la oleada emergente), el implante de N es removido en el día 8.

**2. Estrógenos**

**a) Valerato de estradiol**

El VE aplicado durante el inicio de la fase de crecimiento (día 1; ovulación día 0) suprime el folículo dominante al inducirle atresia (Bó *et al.*, 1995) y desarrollo de una nueva onda folicular (Bó 2002; Macmillan *et al.*, 2003). La supresión del folículo dominante es incompleta, además, su acción prolongada tiene un potencial efecto adverso, retarda la emergencia de la nueva onda folicular. Tiene un efecto luteolítico administrado el día de inserción de los implantes: 5 mg de VE + 3 mg de N i.m.

**b) Benzoato de estradiol. (Macmillan *et al.*, 2003).**

**c) Cipionato de estradiol.**

Induce ovulación. Se aplica 0.5 mg de CE i.m. 24 h después de retirar el CIDER. El día 10 se toma como el día del celo. La mayoría de los animales ovulan en promedio a las 66 horas (día 11). Se realiza la TETF el día 17 (Bó. 2002; Macmillan *et al.*, 2003).

**3. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG).**

El tratamiento con eCG en el día 5 fue subsecuentemente incluido en el protocolo de Progestágenos y Estrógenos (Bó *et al.* 2002; Baruselli. 2010). Consiste en la inserción de CIDER en el día 0 y 2 mg de BE i.m.; 400 UI de

eCG i.m. el día 5; 0.5 mg de clorprostenol sódico (CS) i.m. y retiro del CIDER el día 8; y un segundo tratamiento de 1 mg de BE i.m. el día 9. El día 10 es considerado arbitrariamente como el día del estro y fue seguido por TETF (Siqueira *et al.*, 2009).

#### 4. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Controlar las ondas foliculares con una sola inyección de GnRH en un estado aleatorio del ciclo estral consiste en inducir una liberación de LH, que causa sincronización de la ovulación o luteinización de folículos dominantes. En consecuencia, se inicia una nueva onda folicular en la mayor parte de las vacas (>60%) dentro de 1 a 3 días de la administración de GnRH. El tejido lúteo que se forma va a sufrir luteólisis inducida por PGF2 $\alpha$ , 6 o 7 días más tarde. Un inconveniente de este método de sincronización de celo es que, aproximadamente el 15% de las vacas son detectadas en celo en o antes del día de tratamiento con PGF2 $\alpha$ , reduciendo la proporción de hembras que son detectadas en celo durante el período sincronizado. La segunda inyección de GnRH 48 h después de la PGF2 $\alpha$  induce la liberación de LH que sincroniza la ovulación (Bó *et al.*, 2004; Jones y Lamb. 2008; Macmillan *et al.*, 2003).

Razas *Bos indicus* han demostrado tener una capacidad reducida para la secreción de LH y una mayor sensibilidad a gonadotropinas exógenas que el ganado *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2006).

En el ganado, la liberación de cortisol endógeno mediado por estrés puede suprimir la oleada de LH y la ovulación o disminuir la respuesta ovulatoria, que podría confundirse con falta de sensibilidad a gonadotrofinas exógenas. En ganado doméstico, los tratamientos superovulatorios pueden inducir perturbaciones endocrinas preovulatorias, desordenes de la función y morfología del folículo, anomalías de maduración de los ovocitos e incompetencia, disminución del transporte de espermatozoides y baja tasa de fecundación, baja calidad y viabilidad de los embriones (Lopes da Costa *et al.*, 2001).

## 5. Receptoras recién paridas

La combinación del destete con la inserción de un dispositivo con P4 produce un mayor aumento de la frecuencia de pulsos de LH y la primera ovulación esta seguida de una fase luteal de duración normal. También si se administra GnRH a vacas posparto se inducirá la ovulación, pero los ciclos serán de duración normal solo si se coloca un dispositivo con P4 por 7 a 12 d antes de la GnRH. Por lo tanto la exposición a P4 parece ser necesaria para un desarrollo normal de CL. Esto puede ser consecuencia de un incremento de la frecuencia de los pulsos de LH sobre la producción de estrógenos foliculares, la síntesis de más receptores LH y la luteinización. Otros autores han sugerido, que los altos niveles de PGF2 $\alpha$  secretada por el útero en el periodo posparto pueden ser responsables de la luteólisis prematura y de los ciclos cortos. El tratamiento con P4 causó una disminución y retraso del aumento de los niveles de PGF2 $\alpha$  al día 16 a 18 posterior a la ovulación y resultó en ciclos estrales de duración normal. Como la síntesis de PGF2 $\alpha$  esta muy ligada a la síntesis de receptores de oxitocina en el útero, la P4 disminuiría la liberación de PGF2 $\alpha$  a través de una inhibición de la síntesis de receptores de oxitocina (Bó. 2002).

#### **2.4.- Selección y manejo de donadoras.**

**El primer y probablemente más importante paso en el proceso es la selección de las vacas donadoras. Una hembra que se sabe está libre de enfermedades, v.g. Fiebre Aftosa (Dobrinisky. 2002), anormalidades reproductivas o taras genéticas puede ser usada en TE. Sin embargo, esto no necesariamente determina que ella sea candidata a donadora (Grimes. 2008).**

**De acuerdo al criterio de selección, el valor del producto del donador debe ser suficientemente alto para justificar un gasto más. El criterio de selección puede ser basado en el fenotipo, las relaciones con otros individuos sobresalientes, o algunas combinaciones de estos factores (Grimes. 2008).**

**Algunas consideraciones deben ser tomadas en cuenta para la comercialización de los becerros. La adquisición de una potencial hembra donadora puede ser un propósito costoso. La raza, criterios de selección y oportunidades de mercado son los que eventualmente determinan el valor de una hembra donadora (Dobrinisky. 2002). Los precios pueden promediar desde unas pocas decenas, cientos o miles de dólares o hasta el extremo de cientos de miles de dólares. El criador es el que tiene que determinar el precio de compra que es económicamente factible para su operación (Grimes. 2008).**

**La TE incrementa el número de nacimientos obtenidos de donadoras con alto valor genético y son usadas para diseminar genética deseable en el mundo (Baruselli *et al.*, 2006).**

**Ha sido una premisa ampliamente aceptada en la industria de la TE que para obtener mejores resultados, las hembras donadoras deben tener al menos dos ciclos estrales entre cada superovulación. Con este enfoque, las donadoras se superovulan aproximadamente cada 65–70 d. Las vacas pueden ser primíparas. Las donadoras se superovulan cada 40 días, un promedio de 13.8 veces; algunas vacas “individuales” se superovulan 11 o 16 veces en un período de 18 meses (Hasler. 2003).**

**2.5.- Técnicas de superovulación e Inseminación Artificial (IA) de donadoras.** Hay un acuerdo general en que una severa limitación para el uso más generalizado de la TE es el problema de inducir en forma fiable la superovulación en las donadoras seleccionadas (Aerts y Bols. 2010b; Barros y Nogueira. 2001; Betteridge. 2006; Bó *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2009; Sudano *et al.*, 2011).

eCG administrada sola (Aerts y Bols. 2010b; Barros y Nogueira. 2001; Bó *et al.*, 2010; Khurana y Niemann. 2000; Lehn-Jensen y Rall. 1983; Rizos *et al.*, 2001; Smorag *et al.*, 1981; Sudano *et al.*, 2011) o en combinación con antisuero de eCG (anti-PMSG) (Aerts y Bols. 2010b; Barros y Nogueira .2001; Lopes da Costa *et al.*, 2001), o en combinación con FSH (Barros *et al.*, 2010; Lopes da Costa *et al.*, 2001) o en combinación con LH (Barros *et al.*, 2010); FSH de extractos de glándula pituitaria porcina (Aerts y Bols 2010b; Barati *et al.*, 2006; Barros y Nogueira. 2001; Baruselli *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2005; Grimes. 2008; Hay *et al.*, 1990; Hruska Jr 1991; Khurana y Niemann 2000; Larson *et al.*, 2010; Lopes da Costa *et al.*, 2001; Schiewe *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1989), ovina y equina o FSH recombinante bovina (Barros y Nogueira. 2001), y la gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Aerts y Bols. 2010b) son algunas de las hormonas que se han utilizado para inducir superovulación en la vaca.

La eCG tiene alta actividad LH y una larga vida media (Aerts y Bols. 2010b) de 40 h que permite que una dosis única i.m. induzca respuesta superovulatoria (Lopes da Costa *et al.*, 2001), aunque efectos estimulantes inconsistentes de la eCG y una respuesta marginal relacionada con su larga vida media, causan exagerado desarrollo folicular, fracaso de la ovulación con crecimiento folicular hasta la colección del embrión y perfiles endocrinos anormales junto con pobre calidad de los embriones (Sudano *et al.*, 2011). Por lo cual no se usa como un modulador primario (Aerts y Bols. 2010b). La inyección de un suero neutralizante durante el subsiguiente estro evita la exposición del tracto reproductivo a altos niveles de estradiol

producidos por folículos postovulatorios, para mejorar la calidad de los embriones y la respuesta superovulatoria, aunque estos efectos benéficos han sido cuestionados.

El FSH de origen hipofisario porcino, difiere en su fabricación (Aerts y Bols. 2010b), hay una preparación relativamente cruda con alta actividad LH, en comparación con otros preparados que se purifican y tienen una baja actividad LH, según los fabricantes. La vida media biológica es  $\leq$  de 5 h en la vaca, por lo que se debe aplicar dos veces al día (Aerts y Bols 2010b). La FSH cruda fue dada una vez al día durante 3 días. Las FSH purificadas se aplicaron dos veces al día durante 4 días, también de acuerdo con el fabricante. Se demostró que el contenido de LH (15 a 20%) en preparados de FSH afecta las tasas de fertilización y la calidad de los embriones y que diferentes preparados de FSH habían inducido diferentes resultados superovulatorios (Barros y Nogueira. 2001; Lopes da Costa *et al.*, 2001).

Norgestomet es un progestágeno con mayor actividad biológica que la progesterona natural, la supresión del celo vía el uso de los implantes de silicona de norgestomet ocurre debido a la liberación diaria de aproximadamente 137–138  $\mu$ g de norgestomet desde el implante (Sudano *et al.*, 2011).

Hay evidencias de que la presencia de un folículo dominante al comienzo del tratamiento superestimulador disminuye la producción de embriones (Aerts y Bols. 2010b; Barros y Nogueira. 2001; Sudano *et al.*, 2011). Se han desarrollado estrategias para remover el efecto supresivo (Bó *et al.*, 1995) del folículo dominante al iniciar los tratamientos superestimuladores, tales como FSH a partir del primer día del ciclo estral, aspiración del folículo dominante o de todos los folículos  $\geq$  5 mm de diámetro o sincronizar la onda folicular con estradiol y progesterona (Aerts y Bols. 2010b; Barros *et al.*, 2010; Bó *et al.*, 1995) o ablación del folículo dominante por electrocauterización (Bó *et al.*, 1995).

Los tratamientos para inducir superovulación han evolucionado desde protocolos superestimulatorios que dependían de la detección de celo a tratamientos que sincronizan el crecimiento del folículo y la ovulación, permitiendo una mejora en el manejo de donadoras e Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF). Los protocolos asociados con IATF facilitan el manejo del animal y producen al menos tantos embriones viables como los protocolos de tratamiento convencional que requieren la detección de celo (Barros *et al.*, 2010; Bó *et al.*, 2010).

Una vez que la vaca donadora es seleccionada, es tratada con FSH, esta hormona es administrada dos veces al día durante 4 días, en el intervalo de 8 a 12 días después del estro, con un CL funcional en uno de los ovarios. Como resultado del tratamiento, múltiples folículos pueden desarrollarse en los ovarios de la donadora. Al estro se liberan óvulos en números múltiples. Este proceso se llama superovulación (Grimes. 2008; Lopes da Costa *et al.*, 2001).

Para que la vaca sea llevada al estro, una prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) es inyectada en el cuarto día del plan de la FSH. La prostaglandina causa regresión del cuerpo lúteo y el estro ocurre 48 horas después. La cantidad de FSH dada a la donadora varía basado en sus registros de transferencia (número de embriones y calidad). La respuesta de la donadora a la FSH es altamente variable de vaca a vaca y puede ser origen de gran frustración para el criador. La mayoría de las hembras responden al tratamiento de la superovulación con un promedio de 5 a 7 embriones transferibles (Barati *et al.*, 2006; Hay *et al.*, 1990; Grimes. 2008; Schiewe *et al.*, 1987; Seydel Jr. 2006). Los resultados pueden ir en rangos desde cero hasta alguna docena de huevos por lavado (Grimes. 2008), de 0 a > 60 (Hasler. 2003). Alarcón *et al.*, 2010) reportan 4.5 y 5.3 embriones transferibles en *Bos taurus* y en *Bos indicus*, respectivamente.

Con 20% de las donadoras produciendo 0 embriones, la superovulación seguirá siendo un procedimiento caro e ineficiente. El gasto de las

gonadotropinas, prostaglandinas o implantes de progesterona y el trabajo que involucra aplicar múltiples inyecciones durante un período de días, detección de celo y varias inseminaciones son factores importantes en el costo general de la superovulación (Hasler. 2003).

En casos aislados, algunas vacas individuales no responden al tratamiento a FSH. Algunas vacas que son superovuladas a intervalos regulares disminuyen ligeramente el número de embriones. Hay vacas que no responden a los niveles de FSH dados en forma similar. La mayoría de las dosis promedio de FSH fallan en un 10 a 15% sobre periodos de tratamiento de 4 días. Aún con estos promedios de dosis relativamente estrechos, las vacas responden muy diferente. Algunas vacas pueden producir menor número de embriones de alta calidad, mientras que otras pueden producir mayor número de embriones de baja calidad a la misma dosis. La historia de producción ayuda a determinar la dosis correcta de FSH para una donadora en particular (Grimes. 2008).

Tradicionalmente, los tratamientos con gonadotropinas se iniciaban durante la mitad de la fase lútea, aproximadamente a los 9-11 días del estro alrededor de la emergencia de la segunda ola folicular (Aerts y Bols. 2010b; Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2010; Lopes da Costa *et al.*, 2001).

Por lo tanto, los protocolos de tratamiento convencional tienen dos inconvenientes: (1) el requisito de entrenar personal dedicado a la detección de celo y, (2) la necesidad de contar con todas las donadoras en celo al mismo tiempo para iniciar tratamientos al mismo tiempo (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2010).

El celo de todas las vacas se sincroniza con una inyección intramuscular de 100 µg de GnRH los días 0 y 6, seguida una semana más tarde por 25 mg de PGF2α aplicada por vía intramuscular. Veinticuatro horas después de la PGF2α, los animales fueron observados continuamente para detectar signos de celo durante 72 h. Diez días después de la aparición del celo, un examen rectal se realiza para confirmar la presencia de un CL. Al día siguiente, los

animales son sometidos a un régimen de superovulación mediante dosis decrecientes intramusculares de FSH, cada 12 h (AM-PM) durante 4 días. En el tercer día, se aplican dos inyecciones (AM-PM) de 25 mg de PGF2 $\alpha$  para asegurar la lisis de los CL. Las donadoras se inseminan en 0, 12 y 24 horas después de la aparición de celo. La dosis total de pFSH recomendada para las vacas *Bos indicus* fue de 280 mg y para las vacas *Bos taurus* fue de 400 mg (Barati *et al.*, 2006; Baruselli *et al.*, 2006). La razón de esta diferencia es que las vacas *Bos indicus* son más susceptibles al tratamiento de la gonadotropina, ya que existe un pronunciado efecto sobre el entorno folicular y más folículos inmaduros son reclutados en el tratamiento siguiente (Baruselli *et al.*, 2006). Las vacas fueron inseminadas con espermatozoides de un Toro Probado de la otra especie, es decir, las vacas *Bos taurus* fueron inseminadas artificialmente con *Bos indicus* y viceversa, a fin de obtener embriones F1 (Baruselli *et al.*, 2006; Alarcón *et al.*, 2010).

El tratamiento con gonadotropina coriónica (eCG) en el día 5 fue subsecuentemente incluido en el protocolo. eCG es una glicoproteína secretada por las copas endometriales de la yegua preñada que tiene ambas actividades, LH y FSH, en la vaca. La eCG es un complejo glicoprotéico que tiene una prolongada vida media (más de 40 hrs), lo cual representa una ventaja práctica porque una sola administración induce superovulación ovárica (Bó *et al.*, 2010; Smorag *et al.*, 1981).

Sincronización de la onda folicular con estradiol y progesterona: se ha demostrado que el uso de la progesterona en asociación con estradiol promueve atresia folicular e induce la aparición de una nueva ola folicular, aproximadamente 4 días después del tratamiento. El tratamiento superestimulador de FSH se inicia al comienzo de la nueva ola folicular (es decir, 4 días después de la inserción del dispositivo intravaginal de progesterona y la administración del estradiol). Dos días después de FSH, una dosis luteolítica de PGF2 $\alpha$  es administrada y, 12 horas más tarde, el dispositivo intravaginal es eliminado. Las vacas donadoras son sometidas a

IA 12 y 24 horas después de la detección de celo; 7 días más tarde, los embriones son recolectados, clasificados y congelados o transferidos. Este protocolo tiene dos ventajas: (1) que puede iniciarse en cualquier día del ciclo estral y, (2) no es necesaria la detección de celo antes del tratamiento de FSH. Sin embargo, la detección de celo todavía es necesaria antes de la IA de las donadoras (Barros *et al.*, 2010).

El propósito de estas modificaciones fue para reducir el trabajo y el manejo que se requiere inherente al protocolo original (Baruselli *et al.*, 2006). Vacas donantes Limousine ciclando (n = 403) y Guzerat (n = 239) recibieron un dispositivo intravaginal de liberación prolongada de progesterona y 2 mg de benzoato de estradiol en el día 0. Entre los días 5 y 9, las donantes reciben dosis decrecientes de FSH, que oscilaban entre 200 y 300 UI (*Bos indicus*) y de 300 a 500 UI (*Bos taurus*). En la tarde del día 7, las donadoras recibieron una inyección de 500 µg de clorprostenol y los implantes de progesterona fueron eliminados 12 h más tarde (en la mañana del día 8). La IA se realizó entre las 14 y 26 h después de la primera detección de celo (Castro *et al.*, 2005).

Sin embargo, una mayor respuesta superovulatoria ocurre cuando los tratamientos son iniciados el día de emergencia de la onda folicular, en lugar de 1 día antes o entre uno y dos días más tarde (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2010).

El surgimiento de la ola folicular ocurre sistemáticamente en el momento de la ovulación y experimentos realizados en ganado han indicado que es posible inducir superovulación de la primera onda folicular. Adams *et al.* en 1994, citados por Bó *et al.* (2010), informaron que no hay diferencia en la respuesta superovulatoria cuando los tratamientos con FSH se iniciaron en el momento del surgimiento de la primera o segunda ola folicular. Sin embargo, el éxito se basa en la correcta determinación del tiempo de la ovulación o detección precisa de celo con ovulación esperada 1 día después de la aparición del celo.

El protocolo superovulatorio en vacas donadoras durante la primer ola folicular consiste en la aplicación de un dispositivo de liberación prolongada de progesterona (P4) junto con PGF2 $\alpha$ , seguida por GnRH 7 días después. En el día 0 (36 h) después de GnRH, la superovulación con FSH se inicia (dosis decrecientes dos veces al día por 4 días). La PGF2 $\alpha$  es administrada con las dos últimas inyecciones de FSH y el dispositivo de P4 se remueve en la última inyección de FSH. La ovulación es inducida con LH porcina (pLH) 24 h después de remover el dispositivo de P4, las donadoras son IATF 12 y 24 h después, los embriones son colectados 7 días después del tratamiento de pLH.

La inseminación adecuada de la hembra donadora es un paso crítico en el proceso. La superovulación produce muchos óvulos que serán liberados en el transcurso de varias horas. La aplicación oportuna de semen de alta calidad es necesaria para producir el máximo número de óvulos fecundados. Debido a la variabilidad en el número de óvulos y el momento de su liberación, las donadoras serán inseminadas de 1 a 3 veces durante y después del celo. Un escenario típico sería inseminar las vacas superovuladas a las 12 y 24 horas después de la aparición del calor (Grimes. 2008; Lopes da Costa *et al.*, 2001) o 48 a 60 horas después de la PGF2 $\alpha$  si no se detecta celo (Lopes da Costa *et al.*, 2001). El costo del espermatozoides utilizado probablemente determinará el número de inseminaciones. Como en la inseminación artificial normal, el semen debe colocarse en el cuerpo del útero o a la entrada de cada cuerno uterino (Grimes. 2008).

En el trópico de México, Contreras *et al.* (2008), superovularon vacas Brahman (día 0 = día del comportamiento estral) con una dosis decreciente de 240 mg de FSH durante los días 9-12 del ciclo estral y 25 mg de PGF2 $\alpha$  en la tarde del día 11 y la mañana del día 12 para inducir el celo. En los días 13 y 14, las vacas fueron IA con semen de toro Holstein, 12 y 24 hrs después de la aparición del celo.

## **2.6.- Desarrollo y morfología embrionaria.**

La fecundación implica la penetración del espermatozoide al óvulo y el intercambio genético que ocurre entre ellos. Después que se completa la singamia, se inicia la partición del óvulo fecundado, las divisiones son sincrónicas los primeros días y conforme avanza su desarrollo pierde esta característica (Noriega y col. 1995).

Estadios de desarrollo del embrión viable en el momento de la obtención (Barati *et al.*, 2006; Grimes. 2008; Noriega y col. 1995).

### **a) Mórula temprana.**

Se refiere a una agrupación de células que tienden a ser esféricas, en la cual se pueden observar individualmente los blastómeros, la cuenta celular es difícil. La masa celular ocupa el 80% del espacio perivitelino.

### **b) Mórula madura o compacta.**

La principal característica es la compactación de la masa celular con blastómeros de forma poligonal. En la periferia de la masa celular las células son esféricas. Es imposible la observación individual de los blastómeros. La masa celular ocupa el 60-70% del espacio perivitelino.

### **c) Blastocisto temprano.**

Es un embrión en fase de mórula compacta en la que se empieza a formar una cavidad interna ocupada por fluido conocido como “blastocelo”. El blastocisto tiene una apariencia de anillo y ocupa el 70-80% del espacio perivitelino. La diferencia visual entre el trofoblasto y la masa celular es apreciable. El blastocelo abarca menos del 50% de la masa celular del embrión.

### **d) Blastocisto maduro.**

Se caracteriza por una pronunciada diferenciación entre las células del trofoblasto (que se alarga y extiende en toda la periferia del embrión) y el disco embrionario que es una masa muy pequeña de color muy oscuro. El blastocelo abarca más del 50% del embrión y el embrión ocupa el 90% del espacio perivitelino.

**e) Blastocisto expandido.**

La característica principal es el aumento considerable del diámetro del embrión, así como el adelgazamiento de la zona pelúcida (hasta un tercio de su grosor normal) y la ocupación del 100% del espacio perivitelino.

**f) Blastocisto en eclosión.**

En esta fase de desarrollo, el embrión tiene fisurada la zona pelúcida por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella. El embrión puede tener la forma esférica de un blastocisto expandido o bien estar colapsado.

**Morfología de un embrión en el estadio de blastocisto temprano**

- 1. El embrión bovino tiene un diámetro de 150 a 190 micras.**
- 2. La zona pelúcida tiene un grosor de 12 a 15 micras y está compuesta de mucoproteínas. Su función es aislar y proteger para proporcionar un microambiente especial a la masa celular embrionaria.**
- 3. El espacio perivitelino es el hueco que hay entre la zona pelúcida y la masa celular y es aquí donde se crea el microambiente especial para el embrión.**
- 4. El trofoblasto está constituido por las células diferenciadas aplanadas que van a dar origen a las membranas fetales del embrión.**
- 5. Los blastómeros son la unidad funcional del embrión, su número varía de acuerdo con el desarrollo embrionario.**
- 6. El botón embrionario o masa celular está formado por blastómeros que darán origen al individuo mismo.**

### **2.6.1.-Técnica de obtención, búsqueda y evaluación embrionaria.**

**Siete días después de la IA, se realiza un examen rectal para evaluar el número de CL formados y así poder establecer la respuesta superovulatoria (Alarcón *et al.*, 2010; Noriega y col. 1995; Sudano *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1989).**

**El momento más adecuado para realizar la obtención embrionaria es entre los 6.5 y 8 (Hruska Jr. 1991; Lehn-Jensen y Rall. 1983) días de iniciado el estro, de otra manera se encontrarán embriones muy jóvenes o embriones eclosionados sin zona pelúcida; además, los embriones bajan del oviducto hacia el útero entre el cuarto y el quinto día y antes de ese tiempo es difícil recuperar los embriones, (Noriega y col. 1995).**

**La recuperación generalmente se logra mediante técnicas no quirúrgicas (Alarcón *et al.*, 2010; Barati *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2008; Grimes. 2008; Hruska Jr. 1991; Khurana y Niemann. 2000; Lehn-Jensen y Rall. 1983; Lopes da Costa *et al.*, 2001; Niemann. 1985; Rizos *et al.*, 2001; Sudano *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1989). Los métodos no quirúrgicos de colección de embriones son generalmente preferidos sobre procedimientos quirúrgicos (Smorag *et al.*, 1981) debido a los traumas, riesgo y tiempo que se requieren para la cirugía, aunque la tasa de recuperación puede ser más baja con estos métodos. Se han hecho intentos para reducir el tiempo y la complejidad de los métodos sin disminuir la tasa de recuperación de embriones. La recuperación del número de embriones bovinos por medio de lavar simultáneamente ambos cuernos uterinos se ha reportado similar al método de lavar los cuernos uterinos independientemente (Hay *et al.*, 1990).**

**El proceso de recuperación es relativamente simple y puede ser completado en 30 minutos o menos (Grimes. 2008). La donadora se debe colocar en una trampa que le brinde comodidad y seguridad. El piso debe ser antiderrapante y con una elevación anterior de 15°, esto permite que las vísceras se retraigan hacia atrás, facilitando la manipulación de los órganos genitales (Noriega y col. 1995).**

Una vez que el animal se encuentra en la trampa se inmoviliza sujetándolo por el cuello y se le coloca un tubo a la altura de la tibia para evitar que patee y lastime al técnico que realiza la obtención embrionaria. Después se lava la parte posterior del animal con agua y jabón, eliminando por completo la tierra, pastura y estiércol.

El animal se lava y desinfecta a nivel de la última vértebra sacra y primera coccígea con Benzal o alcohol al 70% (Noriega y col. 1995) y recibe un bloqueo epidural con 5 ml de Xilocaina al 2%, para evitar que la donadora realice movimientos peristálticos rectales y a su vez se evitan movimientos defensivos (Grimes. 2008). Se introduce la mano enguantada para extraer el estiércol, esto facilita aun más la manipulación de los órganos genitales (Noriega y col. 1995), y en este momento se palpan los ovarios para evaluar la respuesta superovulatoria. Las vacas con más de dos CL son “lavadas” (Alarcón *et al.*, 2010; Lopes da Costa *et al.*, 2001).

Antes de iniciar la colección embrionaria se prepara el siguiente material: se conecta una manguera Tygón, un filtro Emm-com y un frasco con medio modificado de Dulbecco's (PBS), con el propósito de enjuagar la manguera Tygón y el filtro Emm-com. Finalmente, la malla del filtro y la manguera Tygón deben permanecer con medio, evitando burbujas de aire (Noriega y col. 1995).

El frasco con medio PBS a 37 °C, se cuelga conectado por un extremo a la manguera Tygón y esta por el otro extremo al filtro Emm-com que se coloca en el piso, a un lado de la trampa, a la sombra y en un lugar seguro.

Se lava la región vulvar (Noriega y col. 1995) y se introduce la sonda Foley de goma flexible y de dos pasos (25”), sobre un mandril de acero inoxidable cubierta con una camisa sanitaria (chemise), para darle rigidez y facilitar el paso por el cérvix, dirigiendo la sonda hacia el cuerno uterino con una mayor respuesta superovulatoria.

El globo del catéter Foley se coloca en el tercio medio del cuerno uterino (Noriega y col. 1995) y es inflado con 10 ml de solución salina para mantener

el catéter en su lugar y evitar reflujo de líquidos (Grimes. 2008). Teniendo cuidado de no inflar demasiado el globo ya que se lesiona la mucosa endometrial y se producen hemorragias, se comprueba que el globo ha quedado fijo en el cuerno uterino, para que al momento del masaje este no permita la salida del medio. Después se retira el mandril y se conecta el extremo posterior de la sonda de Foley a la sonda Tygón. Para la obtención embrionaria se necesitan de 1 a 2 l de Solución Dullbecco's (PBS; Barati *et al.*, 2006; Khurana y Niemann. 2000; Noriega y col. 1995) o solución salina (Grimes. 2008) o Vi-Gro (Alarcón *et al.*, 2010) o solución Hartman tibia. El medio se introduce por gravedad a volúmenes aproximados de 100 a 200 ml, la entrada del medio al cuerno se regula mediante un clamp. La cantidad total del medio varía de acuerdo con la edad del animal, la raza y el tamaño de los cuernos uterinos.

El flujo del medio y el masaje ocasionan que los embriones se desprendan del endometrio. El masaje se realiza suavemente con las yemas de los dedos desde la unión uterotubárica hasta el lugar donde se encuentra el globo. Después se desaloja el líquido del cuerno uterino abriendo el segundo clamp al mismo tiempo que se ejerce masaje. El medio llega al filtro Emm-com por gravedad, se debe cuidar que el medio no se derrame para evitar la pérdida de embriones. Esta operación se repite 3 a 5 veces por cuerno uterino (Grimes. 2008; Noriega y col. 1995).

Una vez terminada la obtención embrionaria del cuerno ipsilateral al ovario con mayor respuesta superovulatoria, se desinfla el globo y se introduce de nuevo el estilete previamente desinfectado, a la sonda Foley que se dirigirá ahora al cuerno uterino donde hay una menor respuesta superovulatoria, se repite la misma operación (Grimes. 2008; Noriega y col. 1995)).

Una vez terminada la obtención embrionaria, a la donadora se le aplica PGF2 $\alpha$  o algún análogo por vía i.m. para destruir los CL y evitar que quede gestante (Noriega y col. 1995).

Terminado el lavado uterino se saca el catéter Foley y junto con la manguera Tygón se enjuaga con PBS para que se desprendan los embriones que hayan quedado adheridos a las superficies del material (Noriega y col. 1995).

El filtro se desconecta de la sonda Tygón y es llevado protegido de la luz solar al laboratorio, donde se debe de manejar con cuidado para evitar que se caiga o se derrame el medio junto con los embriones. El exterior del filtro debe estar completamente limpio, por lo que se debe de proteger con una bolsa de plástico para evitar que se ensucie o caiga materia orgánica adentro; el filtro debe estar previamente identificado ya sea con números o letras, que corresponda con el número de la donadora, raza y color del arete para evitar confusiones entre las razas de los embriones (Noriega y col. 1995).

El lavado del filtro Emm-com, se debe de realizar de una manera rápida y eficaz para garantizar con ello la integridad y supervivencia de los embriones.

1. Antes de quitar la tapadera del filtro Emm-com debe enjuagarse el pivote de la misma.
2. Se destapa el filtro con cuidado.
3. La parte interna de la tapadera se lava y se escurre golpeando ligeramente en el interior de la orilla del filtro.
4. Se inclina el filtro y se abre la pinza dejando escapar el medio hasta la mitad de la malla del mismo.
5. Se lavan las paredes y la parte libre de la malla (donde no contiene líquido), barriendo hacia abajo el detritus, el moco y coágulos adheridos a los embriones.
6. Una vez que aumente el nivel del medio en el filtro se abre la pinza de nuevo, repitiendo la operación cuantas veces sea necesario hasta obtener finalmente un medio cristalino, el cual facilita la búsqueda de los embriones. Los embriones siempre deben permanecer con PBS en el filtro, para evitar cambios de osmolaridad.

7. El medio obtenido del filtro Emm-com se deposita en una caja de Petri.
8. La caja de Petri debe tener cuadros con un área de 1 cm<sup>2</sup> cada uno, de modo que al momento de enfocar en el microscopio estereoscópico con 10 y 12 aumentos se pueda abarcar esta área (Alarcón *et al.*, 2010; Noriega y col. 1995).
9. Las cajas de Petri deben estar estériles.
10. No es recomendable colocar la identificación de las cajas de Petri en las tapaderas pues éstas se pueden cambiar entre una y otra.

Se realizan búsquedas de los embriones en una caja de Petri de 100 X 10 con microscopio estereoscópico de 10 y 12 aumentos (Noriega y col. 1995). La técnica se efectúa en forma rápida y ordenada, de arriba abajo y de izquierda a derecha. Se utiliza una jeringa de insulina con aguja hipodérmica calibre 20 X 32 o 22 X 32 para mover el detritus y encontrar embriones ocultos entre ellos, así como también en las orillas de la caja. Al localizar un embrión se introduce una pipeta Pasteur con un diámetro de 250 a 500 µm con la punta previamente redondeada a fin de no dañarlo y poder extraerlo y depositarlo en la caja de Petri de 35 X 10. Una vez terminada la primera búsqueda de embriones en la caja de Petri de 100 X 10, se realizarán enseguida una segunda y tercera búsqueda embrionaria, antes de iniciarla se agita el medio en forma enérgica con la pipeta Pasteur, se evita el derramamiento y, se espera de 3 a 5 minutos para que desciendan los embriones al fondo de la caja. Se recomienda que la tercera búsqueda la realice otro especialista en TE.

Los embriones se colocan en una caja de Petri de 35 X 10 y se reúnen en el centro de la caja evitando dejar embriones en la orilla. Los embriones transferibles se separan por su estadio y calidad para la congelación y para la transferencia en fresco (Grimes. 2008; Noriega y col. 1995).

Todas las estructuras encontradas en la caja de Petri se registran en la hoja de colección diaria.

Para determinar la fase de desarrollo y calidad se utiliza el microscopio estereoscópico de 40 y 50 aumentos según los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (Alarcón *et al.*, 2010 Noriega y col. 1995).

Calidad del embrión en el momento de la obtención (Barati *et al.*, 2006 Grimes. 2008).

1. - Excelente. Transferible.
2. - Bueno. Transferible.
3. - Regular. No Transferible.
4. - Malo. No Transferible.

Criterios que se toman para la evaluación de los embriones.

a) Estado de desarrollo de acuerdo con la edad

Si se colecta en el 7° día, retrasos de desarrollo de 1 a 1.5 días disminuyen los porcentajes de preñez. Asimismo, embriones de adelanto de desarrollo de 0.5 a 1 día al momento de congelar bajan su porcentaje de viabilidad por pérdida de la zona pelúcida.

b) Número de blastómeros.

Cuando un embrión tiene menos de 30 células en el día 7° es un embrión no transferible. Un embrión será apto para la transferencia, solo cuando el número de blastómeros sea difícil de contar.

c) Compactación celular

Una buena compactación permite la nutrición entre los blastómeros y contribuye a la formación del blastocele. Los blastómeros tienen forma poligonal, tamaño uniforme y simétrico.

d) Color.

La presencia de manchas claras y oscuras o cuando el embrión es muy claro indican la existencia de vesículas, que se asocian con problemas metabólicos. La presencia de vesículas es normal siempre y cuando no sean muy grandes y se localicen en embriones de estadios como blastocistos tempranos y blastocistos maduros.

**e) Blastómeros extruidos.**

Son células que se quedaron en una etapa temprana de desarrollo y se observan como células grandes en el espacio perivitelino. Mientras más blastómeros se encuentren fuera del botón embrionario menor calidad tendrá el embrión.

**f) Zona pelúcida irregular.**

Irregularidades en la zona pelúcida sin ruptura se destinan a la transferencia en fresco.

**g) Detritus celular en el espacio perivitelino.**

La presencia de restos celulares indica el rompimiento de membranas o la degeneración celular, mientras más detritus haya mayor será el grado de degeneración embrionaria.

Actualmente la evaluación morfológica es la forma más práctica para determinar la calidad del embrión, basándose en los porcentajes de gestación obtenidos por embrión (Noriega *et al.*, 1995).

La evaluación de embriones fijados por microscopía de luz (confocal) y electrónica (Aguilar *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2005) ayudan a corroborar que los clasificados como de mala calidad por microscopía estereoscópica (Contreras *et al.*, 2008), realmente poseen malas características morfológicas. Y un alto porcentaje de embriones que fueron clasificados como de buena calidad por este método mostraron características de embriones en proceso de degeneración, por lo que cuando este tipo de embriones se transfieren disminuyen notablemente sus oportunidades de gestar (Aguilar *et al.*, 2002).

**Grados de calidad del embrión**

**Grado 1 o Excelente:** masa embrionaria compacta, simétricamente esférica, color ámbar, tamaño y densidad uniforme. Este embrión es consistente con el estado de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser relativamente menores, y al menos 85% de material celular puede estar intacto, masa embrionaria viable. Este juzgamiento deben estar basado en el

porcentaje de células embrionarias representadas por el material extruido (1 blastómero) en el espacio perivitelino. La zona pelúcida debe tener una superficie plana que pueda causar que el embrión se adhiera a la caja de Petri o a la pajilla (Aguilar *et al.*, 2002; Grimes. 2008; Niemann. 1985; Noriega y col. 1995).

**Grado 2 o Bueno:** al menos 50% del material celular debe estar intacto, (ligera descompactación), masa embrionaria viable, Irregularidades moderadas en el total de la masa embrionaria o en densidad, color y tamaño de las células individuales (un blastómero grande o varios pequeños extruidos; Aguilar *et al.*, 2002; Grimes. 2008; Niemann. 1985; Noriega y col. 1995).

**Grado 3 o Regular:** marcada descompactación, blastómeros extruidos, color oscuro con presencia de vesículas, desechos celulares, irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria o en densidad, color y tamaño de las células individuales. Al menos 25% del material celular debe estar intacto, masa embrionaria viable. Estos embriones se transferirán en fresco, ya que no soportan satisfactoriamente la congelación (Aguilar *et al.*, 2002; Grimes. 2008; Niemann. 1985; Noriega y col. 1995).

**Grado 4 o Malo, No transferible, Muerte o degeneración:** masa 50% de lo normal, retraso en el desarrollo de más de dos días, zonas claroscúras e irregulares en el blastómero. Marcada degeneración embrionaria. También serán clasificados como no transferibles: óvulos, embriones de 2 a 16 células y mórulas tempranas (Aguilar *et al.*, 2002; Grimes. 2008; Niemann. 1985; Noriega y col. 1995).

Se puede notar que la evaluación de embriones es una evaluación subjetiva (Contreras *et al.*, 2008; Grimes. 2008) y no es una ciencia exacta. Para tener una forma sencilla de describir la evaluación de un embrión, se utilizan una serie de números, de manera que podemos saber la etapa de desarrollo y la calificación del embrión. El siguiente código estandarizado es reconocido

por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (SITE; Grimes. 2008; Noriega y col. 1995).

**Cuadro 1. Codificación de las estructuras embrionarias (Grimes 2008; Noriega y col. 1995).**

<b>Estadio</b>	<b>Código</b>	<b>Calidad</b>	<b>Código</b>
Óvulo	1	Excelente	1
Embrión de 2 a 16 células	2	Bueno	2
Mórula temprana	3	Regular	3
Mórula compacta	4	No transferible	4
Blastocisto temprano	5		
Blastocisto maduro	6		
Blastocisto expandido	7		
Blastocisto en eclosión	8		
Blastocisto en eclosión expandido	9		

Una vez terminada la evaluación, los embriones deber ser lavados e identificados.

1. Se usa una pipeta Pasteur para lavar los embriones.
2. Se utiliza PBS con 0.4% de Albúmina Sérica Bovina (ASB) o con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB).
3. Se toma el medio necesario con la pipeta para formar de 7 a 10 gotas en una caja de Petri de 100 X 10.
4. Una vez que se deposita el embrión en una gota, se realizará su lavado al subirlo y bajarlo 5 a 7 veces con la pipeta en las restantes gotas.
5. Para pasarlos a la gota inmediata, es necesario tomar un poco del medio de ella, extraer el embrión y finalmente depositarla en la ulterior gota.
6. Esta operación se repite cuantas veces sea necesario para eliminar en su totalidad el detritus adherido a la zona pelúcida.

- 7. Una vez lavados los embriones se colocan en gotas independientes de PBS.**
- 8. La identificación debe anotarse en la base externa de la caja de Petri de 100 X 10, así como, en la parte externa de su tapadera. Escribiendo los datos abreviados de la donadora, raza y color del arete, estadio y calidad del embrión, y el número de la pajilla que le corresponde.**
- 9. Una vez colocados los embriones individualmente en cada gota se verifica que permanezcan en ella, si se juntan varios en una sola gota deben ser de la misma calidad y estadio. Se cubren las cajas para evitar contaminación. Al transportar las cajas se debe evitar el juntar las diferentes gotas donde se depositaron los embriones (Noriega y col. 1995).**

#### **Preparación e identificación de las pajillas para su congelación**

- 1. Se usan pajillas de 0.25 ml (Noriega y col. 1995; Hruska Jr. 1991; Niemann. 1985).**
- 2. Se debe evitar tomar las pajillas de la punta. Además, se colocan sobre un papel absorbente estéril que no suelte pelusa.**
- 3. Se utiliza un marcador de punto fino, atóxico e indeleble y los datos deben anotarse en forma ordenada, con letra clara y legible**
- 4. El orden de los datos en las pajillas de 0.25 ml se sigue de acuerdo con las normas establecidas por las Asociaciones Internacionales de Transferencia Embrionaria (AITE; Noriega y col. 1995).**

## **2.6.2.-Técnicas de congelación y descongelación embrionaria.**

La inmensa mayoría de embriones bovinos han sido criopreservados usando tasas de congelación y descongelación controladas. Hay numerosas modificaciones, de las cuales exponemos las más comunes (Niemann. 1991).

### **1. Adición de un crioprotector:**

La adopción generalizada de la congelación de embriones en etilenglicol (Alarcón *et al.*, 2010; Grimes. 2008; Niemann 1991; Suzuki *et al.*, 1989) para transferencia directa (TD) después de la descongelación ha hecho la transferencia de embriones congelados más práctica en una amplia variedad de condiciones en el campo (Hasler. 2003; Smorag *et al.*, 1981). Anteriormente, la congelación se realizaba con glicerol 1.4 M al 5% (Hruska Jr. 1991; Lehn-Jensen y Rall. 1983; Niemann. 1985, 1991; Rall. 1992; Smorag *et al.*, 1981) o al 10% (Contreras *et al.*, 2008; Khurana y Niemann. 2000), este permite una alta supervivencia de los embriones bovinos producidos *in vivo* (Leibo y Pool. 2011).

Los embriones son expuestos a glicerol al 10% por un método de tres pasos (3.3%, 6.7% y 10%) con un equilibrado de 10 minutos para cada concentración. La mórula y el blastocisto sobreviven a la congelación igualmente bien (Khurana y Niemann. 2000).

### **2. Carga de los embriones en las pajillas:**

Los embriones individuales son cargados en el centro de las pajillas de 0.25 ml (Niemann. 1991) separados por burbujas de aire de las dos columnas del medio de congelación (Khurana y Niemann. 2000; Noriega y col. 1995). El sellado se realiza por medio de presión en la punta de la pajilla, con una pinza Kelly, posteriormente se sella con calor y se redondea la orilla con los dedos, esto evita que se atoren en la congeladora (Noriega y col. 1995).

### **3. Transferencia a un equipo de congelación:**

Las pajillas son transferidas (Niemann. 1991) directamente a un precongelador de etanol cuando la temperatura del termómetro digital marca 0°C, el algodón de alcohol polivinílico va hacia arriba (Noriega y col. 1995).

Se inicia la congelación descendiendo la temperatura 1°C por minuto hasta alcanzar la temperatura de -7°C. Se prepara un termo cafetero con nitrógeno líquido para sumergir las puntas de una pinza de disección que se utilizará para la cristalización de la pajilla (Noriega y col.1995).

#### 4. Inducción de cristalización:

Procedimientos que controlan las tasas de congelación y descongelación requieren inducción artificial de la cristalización a temperaturas de aproximadamente de -6°C a -7°C en orden de evitar sobrecongelación excesiva de los embriones. Este proceso implica cuatro variables tales como el propio dispositivo de refrigeración, el contenedor de congelación, el volumen de la muestra y el instrumento de cristalización y su temperatura. La alteración de la temperatura debido a la liberación de calor de fusión y el cambio en la osmolaridad requiere un período de adaptación de 5 a 10 min para equilibrar el volumen celular y temperatura. La cristalización manual debe hacerse rápida y cuidadosamente al tocar el segmento de líquido en el extremo opuesto al embrión (Niemann. 1991), hasta observar la formación de una pequeña porción de hielo (Noriega y col. 1995).

#### 5. Congelación lenta:

Cuando se ha formado hielo en toda la columna donde se encuentra el embrión se congela paulatinamente descendiendo -0.6°C por minuto hasta alcanzar la temperatura de -36°C. (Niemann. 1991; Noriega y col. 1995).

#### 6. Inmersión y almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C):

Los bastones con sus gobeletes deberán estar sumergidos en nitrógeno líquido, para poder depositar las pajillas. No se deben exponer las pajillas al ambiente por más de 3 segundos, para evitar ocasionar muerte embrionaria por choque térmico. Los bastones junto con las pajillas se sumergen en nitrógeno líquido a -196°C (Leibo y Pool. 2011; Niemann. 1991; Noriega y col. 1995).

#### **7. Descongelación de las muestras:**

Se retira la pajilla del termo agitándola durante 6 segundos. La descongelación se realiza en agua a 37°C durante 20 segundos, se seca con toalla absorbente desechable, se comprueban los datos del embrión. En la platina caliente del microscopio estereoscópico se coloca la pajilla y se realiza la búsqueda del embrión con el objetivo 12 X. (Contreras *et al.* 2008; Niemann. 1991).

#### **8. Eliminación del crioprotector:**

Dentro de los métodos de remoción del crioprotector el más utilizado es el que se realiza en cuatro pasos, que consiste en colocar los medios para descongelar en una caja de cuatro pozos (multiweldish) en orden consecutivo.

Para que descienda el embrión de la pajilla al medio de descongelación, se coloca la punta de la pajilla previamente cortada en la superficie del medio número 1. Posteriormente se introduce el estilete por la parte superior de la pajilla empujando el algodón y se vacía el medio con el embrión. Evite depositar el algodón en el pozo. El embrión permanece 5 minutos en cada pozo con distinta concentración del medio.

Orden de las diluciones en los pozos de la caja multiweldish:

- a) Pozo 1: medio modificado de Dulbecco's (PBS) [0.4% Albúmina Sérica Bovina (ASB) o 10% Suero Fetal Bovino (SFB)].  
Glicerol 6%.  
Sacarosa 0.3 molar.
- b) Pozo 2: PBS (0.4% ASB o 10% SFB).  
Glicerol 3%.  
Sacarosa 0.3 molar.
- c) Pozo 3: PBS (0.4% ASB o 10% SFB).  
Sacarosa 0.3 molar.
- d) Pozo 4: PBS (0.4% ASB o 10% SFB).

**Se hace una evaluación final y si el embrión es transferible se empajilla con 10% de PBS y 10% de SFB. Una vez concluida la evaluación, se introduce el embrión en una pajilla de 0.25 ml repitiendo la serie de burbujas y columnas. Se confirma la presencia del embrión en la pajilla con el microscopio estereoscópico de 12 X aumentos (Niemann. 1991; Noriega y col. 1995).**

## **2.7.- Método de transferencia embrionaria por vía transcervical.**

**A los siete días de salir en celo y tras la comprobación de la existencia de un cuerpo lúteo a la palpación rectal (Lopes da Costa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1989; Wallace *et al.*, 2011) se realiza la transferencia embrionaria por vía transcervical.**

**Al igual que las hembras donadoras, las receptoras reciben un bloqueo epidural para facilitar la manipulación rectal. La pistola de transferencia cargada con el embrión se pasa cuidadosamente a través de la vulva y el cuello uterino, dirigiéndola lo más adelante en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con el cuerpo lúteo activo (Grimes. 2008; Hruska Jr. 1991; Lopes da Costa *et al.*, 2001; Niemann. 1985; Noriega y col. 1995; Wallace *et al.*, 2011). El embarazo no ocurre a menos que el embrión se coloque en el cuerno uterino con el CL activo (Grimes. 2008). Betteridge (2000), reporta gestación en el cuerno contralateral al CL funcional.**

## **2.8.- Selección y manejo de receptoras.**

En muchos sentidos, el manejo óptimo de receptoras es más crítico para el éxito de un programa de transferencia de embriones que el de las donadoras, ya que de la receptora se espera que quede preñada, mantenga el embarazo hasta término, parir sin asistencia y lograr un ternero de alto mérito genético (Baruselli *et al.*, 2011; Bó *et al.*, 2002; Jones y Lamb. 2008; Siqueira *et al.*, 2009; Wallace *et al.*, 2011).

Porque el mantenimiento de las receptoras representa un alto costo económico (Betteridge. 2003; Bó *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*, 2010; Nasser *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2009), en un programa de transferencia embrionaria, la mayor proporción de animales gestantes después de la TE será el mayor beneficio (Siqueira *et al.*, 2009).

El principal criterio para seleccionar vacas receptoras es que no estén gestantes y con no más de 90 días posparto, menos de cinco partos y sin trastornos patológicos en útero. Facilidad de parto y capacidad materna. Únicamente animales con CL detectado por palpación rectal y con una CC promedio de 2.5 a 3.6 en la escala de 1 a 5. Las novillas pueden utilizarse como receptoras pero en general son un gran riesgo por la dificultad al parto (Alarcón *et al.*, 2010; Grimes. 2008).

Recientemente, un análisis retrospectivo de 8034 receptoras *B. indicus x B. taurus* sincronizadas con un protocolo basado en P4 y estradiol para TETF y, recibiendo un embrión producido *in vitro*, mostró una correlación positiva entre el diámetro del CL (determinado por ultrasonografía) y promedio de gestación (Nasser *et al.*, 2009).

En el mismo estudio, los promedios de gestación fueron también afectados por el número de CL al momento de la TE: los promedios de concepción en receptoras con un CL fueron menores que en receptoras con dos o más CL (45.8% (1880/4109) v. 51.3% (328/639), respectivamente). Estos datos son soportados por otros reportes que muestran un mejoramiento en los promedios de preñez en receptoras *B. indicus X B. taurus* con CL múltiples y

concentraciones de P4 en plasma elevados (Baruselli *et al.*, 2010; Bó *et al.*, 2002; Nasser *et al.*, 2009).

Hay otros reportes considerando el efecto de P4 en promedios de concepción en la literatura. Por ejemplo, Spell *et al.*, (2001) no observan alguna diferencia en concentraciones de P4 en plasma entre receptoras *B. taurus* que quedaron o no gestantes después de la TE. Finalmente, se encontró una declinación en promedios de concepción en receptoras con niveles de P4 arriba de 6 ng/ml (Nogueira *et al.*, 2004).

Estas diferencias pueden ser debido al manejo nutricional y genético (v.g. *B. indicus* v. *B. taurus*). Hay algunas diferencias fisiológicas entre vacas Nelore (*B. indicus*) y Holstein (*B. taurus*): el folículo dominante al momento de la maduración es menor en *B. indicus* que en *B. taurus* (6.0 v. 8.5 mm, respectivamente); el inicio de la capacidad ovulatoria del folículo dominante después del desafío con LH ocurre a un menor diámetro en *B. indicus* comparada con *B. taurus* (7–8.4 v. 10 mm, respectivamente); y el diámetro máximo del folículo dominante (10–12 v. 14–20 mm) y el CL (17–21 v. 20–30 mm) es menor en *B. indicus* que en *B. taurus*. Estas diferencias tienen importantes implicaciones prácticas, porque el cuerpo lúteo es más difícil de palpar en vacas *B. indicus*. Estudios previos han mostrado que las concentraciones de P4 contenido en el CL y P4 en suero son menores en vacas *B. indicus* que en *B. taurus* (Baruselli *et al.*, 2010).

## **2.9.- Transferencia embrionaria en receptoras cebuínas en el trópico.**

### **2.9.1.- Eficiencia reproductiva en vacas cebuínas.**

Para evaluar la eficiencia reproductiva del hato un criterio excelente es la medida del intervalo entre partos (IEP) ya que determina la productividad (Segura. 1987b). El IEP se define como el tiempo comprendido entre un parto y otro. La capacidad reproductiva del ganado *Bos indicus* es pobre comparada con el ganado *Bos taurus* en diferentes temperaturas ambientales (Lamothe-Zavaleta *et al.*, 1991), esta baja eficiencia reproductiva se refleja en una limitada cantidad de becerros producidos en los ranchos, solo 50 % son destetados (Esperón. 1996). En ganado lechero se reporta un IEP ideal de 12.5 meses o 380 días en el altiplano mexicano (Duchateau. 1978). Galina *et al.* (1986) realizaron una revisión de la duración del IEP a nivel nacional y encontraron un valor de 15-16 meses (456-487 días) para el ganado cebú, asimismo, razas *Bos indicus* se reproducen más eficientemente en los meses calientes del año, comparados con razas de *Bos taurus*. Sin embargo, se ha reportado que en el trópico seco mexicano el ganado cebú tiene un IEP promedio de  $537 \pm 194$  días, pero no se observó estacionalidad reproductiva del hato (Martínez. 1994).

Debido a la variabilidad de reportes en el trópico seco (Colima, México) acerca de la estacionalidad en los aspectos reproductivos: época de parto: producción de leche y crecimiento de becerros (Choisis *et al.*, 1987), así como, dos épocas de parto (Marzo-Abril y Septiembre-Diciembre) en ganado de doble propósito (Cervantes *et al.*, 1987); y en el trópico húmedo (Huasteca y Sureste) IEP de 520 días en ganado suizo, 435 días en cruza suizo/cebú y 504 días en holstein/cebú y 406 días en cebú/pardo suizo (De Alba *et al.*, 1985; González *et al.*, 1986). Esperón (1996), reporta resultados de IEP para ganado en el trópico en el cuadro 2 y propone como una meta viable para el trópico mexicano un IEP de 16 meses (480 días), aunque considera que no es el ideal.

**Cuadro 2. Comparación del intervalo entre partos (IEP) en el trópico mexicano (Esperón. 1996).**

<b>AUTORES</b>	<b>IEP (días)</b>
<b>Alvarado (1979).</b>	<b>491</b>
<b>Álvarez (1979).</b>	<b>386</b>
<b>Álvarez R. (1983).</b>	<b>409</b>
<b>Boada (1984).</b>	<b>520</b>
<b>Choisis <i>et al</i> (1987).</b>	<b>478</b>
<b>Fraga (1977).</b>	<b>403</b>
<b>Galina <i>et al</i> (1986). Promedio de 26 investigaciones.</b>	<b>442</b>
<b>González <i>et al</i> (1986).</b>	<b>480</b>
<b>Jana (1980).</b>	<b>476</b>
<b>Ledesma (1976).</b>	<b>480</b>
<b>Lima (1982).</b>	<b>457</b>
<b>Mora (1982).</b>	<b>380</b>

### 2.9.2.- Características del ciclo estral en vacas *Bos indicus*.

Permanecer inmóvil cuando es montada por un toro o compañera de rebaño es el signo principal y más confiable de celo y el mejor indicador de que una vaca o vaquilla está en un estado pre-ovulatorio y sexualmente receptivo. La permanencia inmóvil a la monta define el “verdadero celo” (Orihuela. 2000). Después de la luteólisis, disminuyen las concentraciones séricas de progesterona y concentraciones circulantes de estradiol-17 $\beta$  producidas por el folículo dominante aumentan. La disminución de progesterona y el aumento de estradiol-17 $\beta$  son responsables del comportamiento de celo y la ola preovulatoria de GnRH/LH. El Celos, el periodo de receptividad sexual, dura entre 30 minutos y 27 h en *B. taurus* y entre 1.3 y 20 h (media de 10 h) en *B. indicus* (Bó *et al.*, 2003; Orihuela. 2000). La aparición del celo coincide con la ola preovulatoria de LH seguido de ovulación, en promedio, 26 a 28 h más tarde (Sartori and Barros. 2011).

La duración del celo y su detección es particularmente difícil en *B. indicus* debido a la corta duración del estro conductual (Barros *et al.*, 2010; Bó *et al.*, 2003; Lamothe-Zavaleta *et al.*, 1991; Solano *et al.*, 2005) y la mayor incidencia de celo en la noche que en ganado *B. taurus* (Barros *et al.*, 2010; Bó *et al.*, 2003; Lamothe-Zavaleta *et al.*, 1991). La duración promedio del estro en *B. indicus* es de unas 10 h, con variaciones entre 1,3 y 20 h. Vacas Cebú también promedian sólo una monta por hora en el celo y periodos de estro marcados por una sola monta no son raros (Orihuela. 2000; Solano *et al.*, 2005).

Se reporta un intervalo de aproximadamente 19 h entre la aparición del celo a la ovulación en novillas Brahman, informes más recientes han mostrado un intervalo mayor de 25 a 29 h (Bó *et al.*, 2002; Lamothe-Zavaleta *et al.*, 1991).

### 2.9.3.- Protocolos de Transferencia Embrionaria a Tiempo Fijo (TETF) de receptoras en ambiente tropical.

Los protocolos de Transferencia Embrionaria a Tiempo Fijo (TETF) de receptoras en ambiente tropical han evolucionado desde protocolos para inducir superovulación e IA en donadoras que dependían de la detección de celo a protocolos que sincronizan el crecimiento del folículo y la ovulación, permitiendo una mejora en el manejo de receptoras y TETF (Jones and Lamb. 2008).

Los protocolos de TETF son redefinidos en receptoras cebuínas en ambiente tropical usando implantes de progesterona, estradiol y gonadotropina coriónica equina (eCG; Baruselli *et al.*, 2010).

Tratamientos de estradiol y P4 han ido incrementando su uso en años recientes para TETF (Bó *et al.*, 2002). En general, los tratamientos son muy similares a aquellos usados para inseminación artificial a tiempo fijo excepto que el tratamiento de PGF2 $\alpha$  es dado al inicio.

Por consiguiente, las receptoras reciben un implante auricular de 3 mg de norgestomet de liberación lenta y una inyección i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) y 50 mg de P4 en el día 0; PGF2 $\alpha$  se da en el día 5 (1 día después de la oleada emergente), el implante de P4 es removido en el día 8 y 1 mg, i.m. de BE se da el día 9. El día 10 es considerado el día del estro; por tanto, el embrión es transferido en el día 17 en todas las receptoras con un CL. El anticipo en el tratamiento con PGF2 $\alpha$  fue hecho debido a los resultados de dos experimentos en los cuales se dio PGF2 $\alpha$  al inicio (en el día 5). Incrementando el diámetro del folículo dominante (13.2  $\pm$ 0.2 v. 11.5  $\pm$ 0.2 mm;  $P < 0.05$ ), las concentraciones en plasma de P4 al momento de la TETF (6.9  $\pm$ 0.8 v. 5.2  $\pm$  0.6 ng mL $^{-1}$ ;  $p = 0.08$ ), la proporción de receptoras seleccionadas para transferencia (70.5% v. 52.7%;  $P < 0.02$ ) y el promedio total de gestación (41.1% v. 21.5%;  $P < 0.004$ ), comparada con la administración de PGF2 $\alpha$  al remover el implante el día 8 ( Bó *et al.*, 2002).

El tratamiento con gonadotropina coriónica equina (eCG) en el día 5 fue subsecuentemente incluido en el protocolo (Bó *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*, 2010). La adición de eCG a protocolos TETF basados en P4 resultaron en una alta proporción de receptoras seleccionadas con una tasa de preñez del 50% (Nasser *et al.*, 2004).

Otro protocolo de transferencia de embriones a tiempo fijo utilizado en receptoras cebuínas en Macuspana, Tabasco, consistía en una inyección de 100 µg de un análogo de GnRH y la inserción de un dispositivo de liberación prolongada de progesterona, que permaneció durante 7 días. Después del retiro del implante, recibieron una inyección intramuscular de 25 mg de prostaglandina. Cuarenta y ocho horas después de este evento, recibieron una segunda inyección de 100 µg de GnRH analógico. La TE se realizó 7 días después de la última aplicación analógica de GnRH (Alarcón *et al.*, 2010).

#### **2.9.4.- Condición Corporal (CC) en el ganado cebuino.**

**El registro de la Condición Corporal (CC) es un método fiable para evaluar el estado nutricional de las receptoras. El registro visual de la CC desarrollado para el ganado vacuno utiliza una escala de 1 a 9 (Jones y Lamb. 2008; Wallace *et al.*, 2011) o de 1 a 5 (Houghthon *et al.*, 1990). La ingesta insuficiente de energía, proteínas, vitaminas y de micro y macro minerales ha sido asociada con función reproductiva subóptima. De éstos, el balance energético es probablemente el factor nutricional más importante relacionado con la función reproductiva pobre en ganado (Jones y Lamb. 2008; Wallace *et al.*, 2011).**

**Generalmente, las vacas cebuinas no experimentan un período de balance energético negativo después del parto, pero necesitan tener suficiente condición corporal para reanudar el ciclo estral después del parto y superar el anestro y ciclos estrales cortos e involución uterina para quedar preñadas cada año (Jones y Lamb. 2008).**

**Sólo el 47,2% de las vacas ciclan al comienzo de la temporada de cría; Sin embargo, cuando la CC aumentó, el porcentaje de vacas que ciclan también aumentó. Es importante señalar que cuando las vacas tuvieron una CC inferior a 2 al comienzo de la temporada de reproducción, sólo 33.9% había reanudado su ciclo estral (Jones y Lamb. 2008).**

**Un impacto importante sobre la fertilidad postparto es la duración de la estación de cría. Tener una temporada de reproducción restringida tiene muchas ventajas, pero lo más importante es que una estación de cría de 60 días o menos aumenta el porcentaje de receptoras ciclando y la probabilidad de preñez durante la próxima temporada de cría. La alimentación estratégica para obtener una CC ideal puede lograrse comprendiendo el ciclo de producción de la vaca. El período de mayor necesidad nutricional ocurre poco después del parto; una vaca requiere producir leche para un ternero en crecimiento, recuperar el peso perdido poco antes y después del parto, y reparar su tracto reproductivo para alcanzar la preñez dentro de 3 meses**

después del parto. Durante el posparto, generalmente una vaca está consumiendo tanto alimento como sea posible, y la mejora de la CC en este momento a menudo es inútil. Las vacas pastando normalmente consumen sus requerimientos de proteína, vitaminas y minerales completos, pero la hierba es a menudo exuberante con un alto porcentaje de humedad que puede provocar una deficiencia de energía (Jones y Lamb. 2008).

### **3.- HIPÓTESIS**

El uso adecuado de protocolos de transferencia embrionaria a tiempo fijo en vacas cebuínas en el trópico húmedo de México, podría incrementar el porcentaje de vacas transferibles y el porcentaje de gestación en el hato.

### **4.- OBJETIVO GENERAL**

Comparar tres protocolos de transferencia embrionaria a tiempo fijo usando como parámetros el porcentaje de vacas transferibles y el porcentaje de gestación en el trópico húmedo de México.

### **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

Geográficamente la explotación donde se realizó la experimentación se encuentra localizada en el municipio de Palenque, estado de Chiapas, México. El clima de la región se clasifica como tropical húmedo con lluvias todo el año, del tipo Af según la clasificación de Koppen (1948). Esta zona es una de las más lluviosas del país, en ella la precipitación pluvial anual varía entre 3000 a más de 4500 mm. Tal cantidad de lluvia y su distribución a lo largo del año se debe, entre otros factores, a que estas áreas están expuestas a los vientos del Golfo de México tanto en verano y otoño como en invierno. La temperatura promedio fluctúa de 26 °C a 30°C y la temperatura media del mes más frío es de 18°C (INEGI. 2010).

#### **MANEJO DE HATO**

De un hato de 60 hembras promedio con encaste cebuino en una explotación de tipo extensivo, se seleccionaron mediante palpación rectal un grupo de

hembras vacías por año (2009, 2010 y 2011). A las cuales se les aplicó uno de tres protocolos en un programa de TETF.

Las hembras se mantuvieron a libre pastoreo en potreros de Zacate estrella de África (*Cynodon plectostachyus*), Guinea (*Panicum maximum*) y Jaragua (*Hyparrhenia rufa*).

Durante los tres años del estudio, el manejo de las hembras fue el siguiente:

1. En el primer y segundo grupo la suplementación de sales minerales y vacunaciones fue la misma. En el tercer grupo las sales minerales fueron controladas y de mejor calidad.
2. Retiro de sementales 50 días antes, para evitar incluir en el experimento vacas con gestaciones muy tempranas que podrían tomarse como vacías.
3. Las hembras fueron examinadas previamente por palpación rectal para descartar:
  - a) Alteraciones anatómicas en el tracto reproductor: especialmente cervicitis (cérvix cerrados o desviados) que impidan el pase del catéter de transferencia. Lo que se comprobó con la maniobra de rutina, con el pase de la pistola de inseminación americana, en los protocolos B y C.
  - b) Infecciones clínicas que puedan afectar la fertilidad.
  - c) Se descartan vacas gestantes.
4. Se registraron las estructuras ováricas y se determinó la actividad ovárica cíclica.
5. Para evaluar las vacas se utilizó la Condición Corporal en la escala de 1 a 5 de Houghton *et al.* (1990).
6. En general, se maneja al hato en mangas de madera sin trampa de contención, se compactan los animales con separadores de madera quedando oprimidos en forma transversal, para aplicar inyecciones o realizar exploración rectal.

En el primer protocolo (aplicado en el año 2009), se formó un grupo de 25 vacas receptoras, las que tuvieron una CC de 2.5 promedio en la escala de 1 a 5 de Houghton *et al.* (1990). Entre ellas quedaron incluidas hembras lactantes en anestro y hembras ciclando no lactantes (no se realizó paso de pipeta de IA), a las cuales se les aplicó el tratamiento, que se muestra en la figura 1. El día 0, aplicación de un implante por vía subcutánea en la superficie exterior de la oreja, las vacas se amarraron de la cabeza con lazos lo que facilitó la aplicación y retiro de los implantes de norgestomet, el cual contiene 3 mg de norgestomet, al mismo tiempo se les aplicó una inyección i.m. que contiene 3mg/5mg de N/valerato de estradiol (VE). El día 9 retiro del implante de la oreja. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron vacas que presentaron CL >2cm<sup>2</sup>, con embriones obtenidos *in vivo* (grado 1, estadíos 6 y 7) congelados en glicerol de la raza Blonde D´Aquitaine. El diagnóstico de gestación se realizó por examen transrectal a los 120 días postransferencia embrionaria.

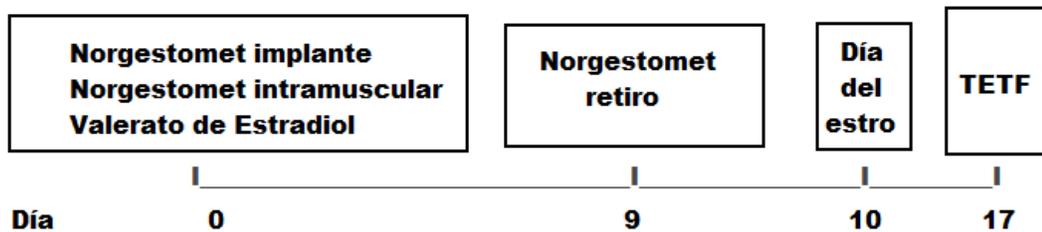


Fig. 1. TETF 2009. El día 0, aplicación de un implante por vía subcutánea en la superficie exterior de la oreja, el cual contiene 3 mg de Norgestomet (N), al mismo tiempo se inyecta 3mg/5mg i.m. de N/Valerato de estradiol (VE). El día 9 retiro del implante de la oreja. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron vacas que presentaron CL >2cm<sup>2</sup>, con 1 embrión obtenido *in vivo* (grado 1, estadio 6 o 7) congelado en glicerol de la raza Blonde D´Aquitaine.

El segundo protocolo (aplicado en el año 2010), se usaron 20 vacas como receptoras, las que tuvieron una CC de 2.5 promedio en la escala de 1 a 5 de Houghton *et al.* (1990). Entre ellas quedaron incluidas hembras lactantes en

anestro y hembras ciclando no lactantes, probando la normalidad del cérvix mediante paso de pipeta. Se les aplicó el tratamiento, que se muestra en la figura 2. El día 0 un CIDER con 1.9 gr. de P4 y 2 mg i.m. de BE. El día 8 retiro del CIDER, 0.15 mg i.m. de PGF2 $\alpha$ . El día 9, 1 mg i.m. de BE. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron 16 vacas que presentaron CL >2cm<sup>2</sup>, con embriones obtenidos *in vivo* (grado 1, estadios 6 y 7) congelados en glicerol de la raza Brangus Negra. El diagnóstico de gestación se realizó por examen transrectal a los 60 días postransferencia embrionaria.

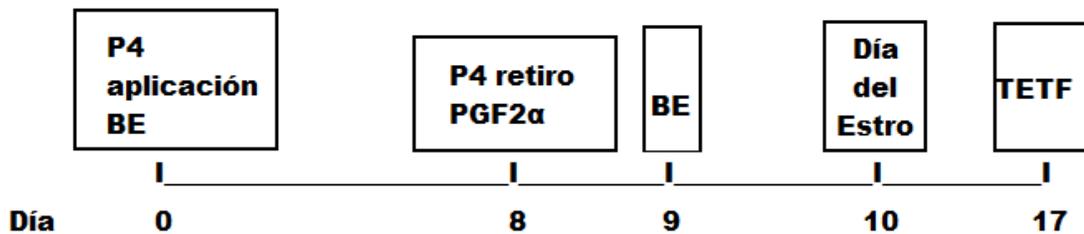


Fig. 2. TETF 2010. El día 0 aplicación de un dispositivo intravaginal de 1.9 gr de progesterona (CIDER) y 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE). El día 8 retiro del CIDER, 0.15 mg i.m. de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). El día 9, 1 mg i.m. de BE. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron vacas que presentaron CL >2cm<sup>2</sup>, con 1 embrión obtenido *in vivo* (grado 1, estadio 6 o 7) congelado en glicerol de la raza Brangus Negra.

Tercer método (aplicado en el año 2011), 25 vacas receptoras con CC 2.8 promedio, entre ellas quedaron incluidas hembras lactantes y no lactantes ciclando, comprobándose la penetrabilidad cervical. Cada vaca se suplementó desde treinta días antes del inicio del protocolo con 2 Kg. de concentrado con 18% de PC, 80 g de sales minerales: Mg, Ca, P, Na; 40 ml de aceite de maíz, diariamente y hasta la fecha del diagnóstico de gestación. Además, se les aplicó el siguiente tratamiento, ver fig. 3. El día 0 un CIDER, 1 mg i.m. BE, 35mg/350mg i.m. de Selenio/vitamina E. El día 8 retiro del CIDER, 0.15 mg i.m. de PGF2 $\alpha$ , 300 u.i. i.m. de eCG. El día 9, 0.5 mg i.m. de BE. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 fueron transferidas las hembras

que presentaron CL  $>2\text{cm}^2$ , con embriones frescos de un toro de la raza Hereford. 2 embriones fueron transferidos por receptora (grado 1, estadios 7 y 8). El diagnóstico de gestación se realizó por examen transrectal a los 60 días postransferencia embrionaria.

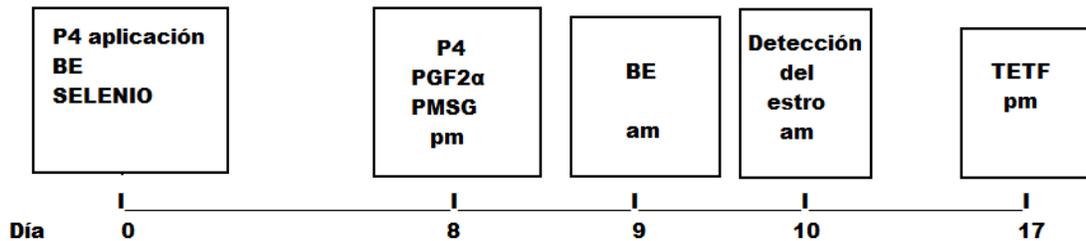


Fig. 3. TETF 2011. El día 0, aplicación de un dispositivo intravaginal de 1.9 gr de progesterona (CIDER), 1 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE) y 35mg/350mg de Selenio/ADE i.m. El día 8 retiro del CIDER, 0.15 mg i.m. de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), 300 u.i. i.m. de gonadotropina coriónica equina (eCG). El día 9, 0.5 mg i.m. de BE. El día 10 se toma como el día del celo. El día 17 se transfirieron 2 embriones fertilizados *in vitro* (grado 1, estadios 7 y 8) frescos de la raza Hereford a las vacas que presentaron CL  $>2\text{ cm}^2$ .

## 6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A pesar de las limitantes metodológicas que presentan los tres trabajos independientes que conforman el estudio de caso se compararon tres protocolos de TETF usando el porcentaje de gestación (PG). Se aplicó la prueba “t” para proporciones (Daniel. 2005). Para ello se utilizó el programa Micro-STAT en su versión 1.1 (López y Escobar. 1996).

## 7.- RESULTADOS

La prueba “t” indicó que hay una diferencia significativa entre los protocolos de TETF. Usando el porcentaje de gestación, el protocolo C obtuvo el

porcentaje de gestación más alto que es significativamente mayor a los porcentajes de los protocolos A y B ( $P < 0.01$ ), ver tabla 1.

**Tabla 1. Comparación de los protocolos de TETF usando el porcentaje de gestación (nº de receptoras preñadas/transferidas) en *Bos indicus* X *Bos taurus* en el trópico húmedo**

<b>Protocolo</b>	<b>Vacas Transferidas</b>	<b>Vacas Gestantes</b>	<b>Vacas No Gestantes</b>	<b>% Gestación</b>
<b>A</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>35<sup>b</sup></b>
<b>B</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>18.75<sup>b</sup></b>
<b>C</b>	<b>23</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>56.52<sup>a</sup></b>

Letras diferentes entre renglones denotan diferencias significativas. Comparación métodos A y B  $P > 0.05$ . Comparación métodos A y C  $P < 0.1$ . Comparación métodos B y C  $P < 0.01$ .

**Tabla 2. Eficiencia de los protocolos de TETF (nº de receptoras tratadas/transferidas) y sus porcentajes de gestación en *Bos indicus* x *Bos taurus* en el trópico húmedo de México en los años 2009, 2010 y 2011**

--	--	--	--	--	--

<b>Año</b>	<b># receptoras tratadas con CL y su porcentaje</b>	<b># receptoras tratadas sin CL y su porcentaje</b>	<b>Total receptoras tratadas y su porcentaje</b>	<b>Total de receptoras transferidas y su porcentaje</b>	<b># receptoras gestantes y su porcentaje</b>
<b>2009</b>	<b>14(56%)<sup>b</sup></b>	<b>11(44%)</b>	<b>25(100%)</b>	<b>20(80%)<sup>a</sup></b>	<b>7(35%)</b>
<b>2010</b>	<b>4(20%)<sup>b</sup></b>	<b>16(80%)</b>	<b>20(100%)</b>	<b>16(80%)<sup>a</sup></b>	<b>3(18.75%)</b>
<b>2011</b>	<b>8(32%)<sup>b</sup></b>	<b>17(68%)</b>	<b>25(100%)</b>	<b>23(92%)<sup>a</sup></b>	<b>13(56.52)</b>

Letras diferentes entre columnas denotan diferencias significativas.  
Comparación protocolos 2009 ( $P < 0.05$ ), 2010 y 2011 ( $P < 0.001$ ).

### **Gestaciones y partos de los tres protocolos de TETF.**

**Resultados del protocolo A, de 7 vacas gestantes, parieron 2 vacas, nacieron 3 becerros: un macho y una hembra de parto gemelar y, una hembra. Las restantes se vendieron cuando el rancho ganadero cambió de giro.**

**Resultados del protocolo B, parieron 3 vacas, nacieron dos machos y una hembra, ver fotografía 1.**

**Fotografía 1.**



**Resultados del protocolo C, de 13 vacas gestantes, 11 vacas parieron y dos abortaron. 7 vacas tuvieron partos gemelares y 4 vacas partos simples, con un total de 18 crías, de las cuales 16 fueron hembras y 2 machos, ver fotografía 2.**

**Fotografía 2.**



## **8.- DISCUSIÓN**

**En este trabajo los distintos porcentajes de gestación obtenidos en los tres protocolos, ver tabla 1, son consistentes con las grandes diferencias que se han encontrado en las tasas de gestación obtenidas con otros protocolos usados en la TE, debido a su gran variación, estas disparidades han afectado negativamente el uso de estos métodos por un gran número de productores (Aguilar *et al.*, 2002; Alarcón *et al.*, 2010; Baruselli *et al.*, 2010 Bó *et al.*, 2004).**

**El protocolo A, aplicado en esta tesis arrojó un porcentaje de gestación de 35% que se acerca al porcentaje reportado por Reis *et al.* (2004) de 48.4%,**

estadísticamente hubo diferencias con el protocolo B que fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) con un 18.75% de preñez, estas diferencias se pueden explicar por varios factores ambientales; en primer lugar la CC del lote que fue 2.5 promedio y que un alto porcentaje de ellas tenían becerro al pie; en segundo lugar el mes de mayo, que es el mes en que la temperatura ambiental alcanza picos por arriba de los 40°C (además que se transfirió al mediodía). Fair (2010) reporta reducción de fertilidad en vacas expuestas a stress calórico, asimismo, Morton *et al.* (2007) demostraron en un análisis retrospectivo que una carga de calor alta tiene un efecto detrimental en la tasa de concepción de hasta 5 semanas antes del servicio. Este efecto de baja en la calidad del oocito y retardo en el desarrollo embrionario, había sido reportado previamente y puede ser superado por ablación de la cohorte folicular deteriorada durante dos ciclos estrales o usando embriones frescos en la transferencia (Fair. 2010). Otro factor que pudo haber influido en este lote, es que en ningún momento se les suministró alimento balanceado de apoyo. Sin embargo, estos resultados del protocolo A se pueden considerar superiores a los reportados por Galina y Arthur (1990) y Alarcón *et al.* (2010) en el trópico húmedo de México del los cuales se obtuvo un promedio de 28%. El porcentaje de gestación del protocolo C de 56.52% es superior al reportado por Reis *et al.* (2004) de 48.4%, mejorando en un 6%.

Los embriones bovinos que son producidos *in vitro* son diferentes de su contraparte obtenidos *in vivo*. Estas diferencias incluyen no solamente cambios en la morfología, color, densidad, número total de células, su habilidad para sobrevivir la criopreservación, sensibilidad al frío, sino también la relativa abundancia de desarrollo de importantes genes de transcripción. El interferón juega un rol importante en la comunicación materno-embrionaria y esta es fundamental para el mantenimiento del CL y para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Además, Stinshof *et*

*al.* (2011), demostraron mayor producción de interferón-tau2-mRNA (IFNT2) en embriones producidos *in vitro* la cual asocian con pobre calidad.

Los porcentajes de gestación obtenidos en los dos primeros protocolos (A=35% y B=18.75%) transfiriendo embriones congelados de calidad grado 1, obtenidos *in vivo* son menores a los PG del 47.5% promedio con embriones congelados producidos *in vivo* después de descongelar y transferir reportados por Reis *et al.* (2004). Estos resultados se pueden explicar a que los embriones considerados de buena calidad por microscopía estereoscópica, al momento de ser evaluados con microscopía de luz o electrónica resultan ser de calidad inferior, como lo reportan Aguilar *et al.* (2002) y Elsdén *et al.* (1978). El porcentaje de gestación obtenido con el tercer protocolo (C=56.52%) transfiriendo embriones frescos de calidad grado 1, producidos *in vitro*, son superiores a los PG del 48.4% promedio con embriones frescos producidos *in vitro* después de descongelar y transferir reportados por Reis *et al.* (2004). Esto podría explicarse a que los embriones de calidad grado 1 obtenidos *in vitro* se transfirieron frescos. Sin embargo, Yao *et al.* (2009) citados por los mismos autores, no encontraron ninguna diferencia en la expresión de IFNT2 entre los embriones generados *in vivo* e *in vitro* después de la criopreservación convencional.

Respecto al porcentaje de gestación obtenido con diferentes grados y estadios de desarrollo de los embriones transferidos, se sabe que embriones con desarrollo adelantado de 0.5 a 1 día al momento de congelar bajan su porcentaje de viabilidad (Noriega y col. 1995) y consecuentemente las tasas de preñez. Los resultados de esta tesis donde se compararon tres protocolos de TETF usando el porcentaje de gestación, transfiriendo únicamente embriones de grado 1, pero de distintos estadios (6, 7 y 8), son diferentes a los encontrados por Bó *et al.* (2004) quienes señalan que las mórulas y blastocistos tempranos tienen un mayor porcentaje de preñez que los blastocistos o blastocistos expandidos ( $P < 0.05$ ).

Vale la pena resaltar que los resultados del protocolo C, arrojaron también, que 7 de las vacas gestantes tuvieron partos gemelares y 4 vacas partos simples, con un total de 18 crías, de las cuales 16 fueron hembras y 2 machos. En función de que la fertilización de los embriones se realizó con semen sexado hacia hembras; además se aplicaron dos embriones por receptora. Estos resultados se pueden explicar por factores inherentes al protocolo empleado ya se apoyó al lote C de vacas usadas en este estudio con alimento balanceado un mes antes de la sincronización y hasta dos meses después de la TE, así como con la administración de sales minerales: Mg, Na, P Y Ca, la inyección de Selenio-vitamina E, además de agregar al protocolo eCG.

Confirmando que en cualquier protocolo empleado en el trópico húmedo de México, la CC, el manejo y el empleo de sales minerales y hormonas de apoyo, pueden incrementar significativamente los porcentajes de gestación. Por otra parte, estos resultados obtenidos en el protocolo C son prometedores como una alternativa eficiente en el mejoramiento genético de cualquier ható ganadero, en especial en el trópico húmedo donde los resultados reportados por otros autores no habían alcanzado el 40% de tasa de gestación en México (Alarcón *et al.*, 2010; Galina y Arthur. 1990).

## **9.- CONCLUSIÓN**

Se concluye que el tercer protocolo aplicado en el año 2011 en un programa de TETF en receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* en el trópico húmedo mexicano es el que mayor porcentaje de gestación produce.

## **10.- RECOMENDACIONES**

Por lo cual surgen las siguientes recomendaciones: transferir a las receptoras por la mañana (de 06:00 a 09:00 horas) o por la tarde (de 17:00 a 19:00 horas) para evitar el estrés calórico. Transferir dos embriones frescos por receptora. Instalar el laboratorio móvil, con clima controlado a una

temperatura de 27°C cerca del corral de manejo. Se deberán formar equipos de trabajo que optimicen la sincronización y la transferencia embrionaria. Asimismo, es infructuoso implementar programas de TETF si los animales en pastoreo no reciben una alimentación adecuada mediante la suplementación de grano, sales minerales y aceite de maíz que les permita mantenerse antes, durante y después de la transferencia en una condición corporal por arriba de 2.5 en la escala de 1 a 5.

## **11.- ABREVIATURAS**

**AM:** antes meridiano.

**ASB:** albúmina sérica bovina.

**BE:** benzoato de estradiol.

**CC:** condición corporal.

**CE:** cippionato de estradiol.

**CIDER:** dispositivo de liberación lenta de progesterona.

**CL:** cuerpo lúteo.

**CS:** clorprostenol sódico.

**d:** día.

**ds:** desviación estándar.

**E2:** estradiol.

**eCG:** gonadotropina coriónica equina.

**FSH:** hormona folículo estimulante.

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas.

**h:** hora.

**hCG:** gonadotropina coriónica humana.

**hMG:** gonadotropina menopáusica humana

**IIP:** intervalo interpartos.

**INFT2:** interferón tau 2.

**LH:** hormona luteinizante.

**LHR:** receptores de hormona luteinizante.

**N:** norgestomet.

**PBS:** medio modificado de Dulbecco's

**P4:** progesterona.

**pFSH:** hormona folículo estimulante de origen hipofisario porcino.

**PG:** porcentaje(s) de gestación.

**PGF2 $\alpha$ :** prostaglandina F 2 alfa.

**pLH:** hormona luteinizante de origen hipofisario.

**PM:** pasado meridiano.

**PMSG:** gonadotropina sérica de yegua preñada.

**PP:** postpartum.

**SFB:** suero fetal bovino.

**SO:** superovulación.

**TD:** transferencia directa.

**TG:** tasa(s) de gestación.

**TETF:** transferencia embrionaria a tiempo fijo.

**UI:** unidades internacionales.

**VE:** valerato de estradiol.

## **12.- BIBLIOGRAFÍA**

- 1. Aerts J. M. J. and Bols P. E. J. 2010. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in Domestic Animal*, 45: 171-179.**
- 2. Aerts J. M. J. and Bols P. E. J. 2010. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reproduction in Domestic Animal*, 45: 180-187.**
- 3. Aguilar M. M., Galina S. C., Merchant H., Montiel F., Canseco R., Márquez Y. C. 2002. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animal*, 237: 341-346.**
- 4. Alarcón A. M. & Galina S C. & Corro D. M. & Asprón. A. M. 2010. Embryo transfer, a useful technique to be applied in small community farms? *Tropical Animal Health Production*.**
- 5. Améndola R. D. 2002. A dairy system based on forages and grazing in temperate México. (PhD) Thesis. The Netherlands: Wageningen University.**
- 6. Barati F., Niasari-Naslaji A., Bolourchi M., Sarhaddi F., Razavi K., Naghzali. Thatcher W. W. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*, 66: 1149-1155.**
- 7. Barros C. M and Nogueira M. F. G. 2001. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 56: 1463-1496.**
- 8. Barros M. C., Ereno L, R., Simões A. L., Renato F. P., Buratini J. and Nogueira F. G. M. 2010. Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 132-137.**

9. Baruselli S. P. de Sa´ Filho F. M. Claudiney M. M. Nasser. F. L. Nogueira F. G. M. Barros M., Bo A. G. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65: 77-88.
10. Baruselli P S., Ferreira M. R., Sá Filho M. F., Nasser F. T. L., Rodrigues A. C. and Bó. G. 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 67-74.
11. Baruselli S. P. Ferreira. M. R. Sales N. J. Gimenes U. L. Sá Filho F. M. Martins C. M. Rodrigues C. A., Bó A. G. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76 (9): 1583-1593.
12. Betteridge J. K. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79: 203-244.
13. Betteridge J. K. 2000. Reflections on the golden anniversary of the first embryo transfer to produce a calf. *Theriogenology*, 53: 3-10.
14. Betteridge J. K. 2006. Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology*, 65: 905-913.
15. Biggers J. D. 1991. Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *Journal of Reproduction and Fertility*, 93: 173-186.
16. Binelli M. and Murphy B. 2010. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 1-12.
17. Bó A. G., Adams G. P., Pierson R. A. and Mapletoft R. J. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43: 31-40.
18. Bó A. G. 2002. Dinámica folicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Católica de Córdoba. Argentina. P 17.

19. Bo A. G., Baruselli P. S., Moreno D., Cutaia L, Caccia M., Tribulo J. R., Tribulo E. H. and Mapletoft R.J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57: 53-72.
20. Bó A. G., Baruselli S. P. y Martinez M. F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78: 307–326.
21. Bó A. G., Moreno D., Cutaia E. L., Caccia. M., Tribulo J. R. y Tribulo E. H. 2004. Transferencia de embriones a tiempo fijo: Tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus*. Año 4, N° 21. Pág. 25-45. Abril.
22. Bó A. G., Guerrero D. C., Tríbulo A., Tríbulo J. R., Tríbulo E. H, Dragan R. and Mapletoft. J. R. 2010. New approaches to superovulation in the cow. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 106-112.
23. Boer H. M., Stötzel T., Röblitz C. S., Deuflhard P., Veerkamp. R. F. and Woelders H. 2011. A simple mathematical model of the bovine estrous cycle: Follicle development and endocrine interactions. *Journal of Theoretical Biology*, 278: 20-31.
24. Bridges P. J. and Fortune J. E. 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 25: 199-214.
25. Bridges G. A., Mussard M. L, Burke C. R., Day M. L. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*, 117: 208-215.
26. Canales S. A. 2011. En México, más de cinco millones de personas son analfabetas. Instituto de Investigaciones Sobre la Universidad y la Educación. Boletín UNAM-DGCS-530. Ciudad Universitaria. 8 de septiembre del 2011.

27. Castro A. S., Neto B. V., Sánchez M., Binelli S. M. M., Perri S. H. and García J. F. 2005. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, 63: (5) 1249-1255.
28. Cervantes N., Choisis J. P. y Lhoste P. 1987. Épocas de nacimiento e intervalos entre partos en el trópico seco (Edo. de Colima). *Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Buiatría y del XIII Congreso Nacional de Buiatría*, p 71-74.
29. Choisis J. P., Cervantes C. N y Galina H. M. A. 1987. Diagnóstico dinámico de unidades bovinas de doble propósito en el trópico seco. Colima. Reunión de Investigación Pecuaria. México. p 249-250.
30. CONEVAL. 2009. Informe de evolución histórica de la situación nutricional de la población y los programas de alimentación, nutrición y abasto en México.  
[http://www.coneval.gob.mx/cmsconeval/rw/resource/coneval/eval\\_mon/Informe%20de%20evolucion%20historica%20de%20la%20situacion%20nutricional%20de%20la%20poblacion.pdf?view=true](http://www.coneval.gob.mx/cmsconeval/rw/resource/coneval/eval_mon/Informe%20de%20evolucion%20historica%20de%20la%20situacion%20nutricional%20de%20la%20poblacion.pdf?view=true)
31. Contreras A. D., Galina S. C., Ávila G. J., Asprón P. M., Moreno-Mendoza N. 2008. A system to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture. *Animal Reproduction Science*, 106 (3-4): 369-379.
32. Daniel W. W. 2005. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ª ed. Limusa. México.
33. Dean M. and Dailey R.A. 2011. The ability of subordinate follicles of the second follicular wave to become dominant is lost by day 15 of the estrous cycle in cattle. *Animal Reproduction Science*, 126: 162-167.
34. De Alba J. 1985. *Reproducción Animal*. La Prensa Médica Mexicana. México. 1ª ed. P 538.

35. Del Castillo C. P. 2011. El trópico mexicano: una potencia productiva. AAPAUNAM, Academia, Ciencia y Cultura. Año 3, N° 2 abril-junio.
36. Diskin M. G., Mackey D. R., Roche J. F., Sreenan J. M. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78: 345-370.
37. Dobrinsky J. R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57: 285-302.
38. Duchateau B. A. 1978. Eficiencia reproductiva del ganado lechero en México. Curso de actualización en aspectos reproductivos del ganado bovino lechero. FMVZ. UNAM México. p 7-10.
39. Elsdén R. P., Nelson L. D. y Seidel Jr. G. E. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. January Vol. 9 no. 1.
40. Esperón S. A. E. 1996. Efecto estacional en la fertilidad de hembras cebuínas inseminadas después de aplicar un implante hormonal. Tesis de Maestría. Universidad de Colima. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P 107.
41. Esperón S. A. E. 2000. Efecto de la transferencia de tecnología y su impacto en la reproducción en el sistema de producción bovina de doble propósito en el oriente de Colima. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P 175.
42. Fair T. 2010. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 13-20.
43. FAO-SAGARPA. Evaluación, Establecimiento de Praderas. 2001. Sistema de Evaluación de la Alianza para el Campo. disponible en: <http://www.evalalianza.org.mx>.

44. Forde N., Beltman M. E., Lonergan P., Diskin M., Roche J. F., Crowe M. A. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124: 163-169.
45. Galina S. C., Duchateau A. y Navarro-Fierro R. 1986. Assesment of the reproductive efficiency of *Bos indicus* cattle in the tropical areas of Mexico. *Memorias de la Reunión de la Agencia Internacional de Energía Atómica. México*. pp. 215-223.
46. Galina S. C. and Arthur H. G. 1989. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 4. Parturition and Calving Intervals. *Animal Breed (Abstracts)*, 57: 679-686.
47. Galina S. C. and Arthur H. G. 1990: Review on cattle reproduction in the tropics. Part 5. Fertilization and pregnancy. *Animal Breed (Abstracts)*, 58: 805-813.
48. Galina M. A. y Guerrero M. 1992. Recursos y necesidades pecuarias de México. Editorial UNAM. Cuautitlán, México.
49. Galina M. A. y Guerrero M. 1993. La ganadería mexicana, características y perspectivas del sector. *Avances en Investigación Agropecuaria*. Vol. 2. Núm. 1: 13-40.
50. Galina S. C. y Valencia M. J. 2006. Reproducción de Animales Domésticos. Segunda Edición. Ed. Limusa. México. P. 577.
51. Ginther O. J., Bergfelt D. R., Kulick L. J. and Kot K. 1998. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology*, 50: 507-519.
52. González D. J., Rueda M. B., Gómez C. V., Lara V. E. y Román H. 1986. Mejoramiento continuo para incrementar la producción de leche y carne en ranchos ganaderos de Papantla, Veracruz. *Reunión de Investigación Pecuaria en México*. Noviembre 3, 4 y 5. Unidad de Congresos. C. N. M. IMSS. p 100.
53. Grimes F. J. 2008. Utilization of Embryo Transfer in Beef Cattle. *Agricultura and Natural Resources*, The Ohio State University.

54. Hafez E. S. E. y Jainudeen M. R. 1974. Reproductive failure in females. En: *Reproduction in farm animals*. E. S. E Hafez (Ed). 3th. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 480 p.
55. Hafez E. S. E. y Hafez B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Séptima Edición. Ed. McGraw-Hill. México. 519 p.
56. Hasler F. J. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, 79: 245-264.
57. Hay J. H., Phelps D. A., Hanks D. R. y Foote W. D. 1990. Sequential uterine horn versus simultaneous total uterine flush to recover bovine embryos nonsurgically. *Theriogenology*, Vol. 33 No. 2.
58. Houghton P., Lemenger R. P., Moss G. E. y Hendrix K. S. 1990. Prediction of postpartum beef cow composition using weight to height ratio and visual body condition score. *Journal Animal Science*, 68: 1428-1437.
59. Hruska Jr. K. 1991. The effect of length of cryopreservation on the viability of bovine embryos in a commercial operation. *Theriogenology*, vol. 36. 3: 477-484.
60. INEGI. 1990. Agenda estadística 1989. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Aguascalientes, Ags, México. P. 256.
61. INEGI. 2010. Productos y servicios. [citado el 26 de enero del 2011; 13:00 hrs]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mex>.
62. Jones A. L y Lamb G. C. 2008. Nutrition, synchronization and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 69: 107-115.
63. Khurana N. K. y Niemann. H. 2000. Effects of cryopreservanon on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology*, 54: 313-326.

64. Koppen W. 1948. Climatología. Primera edición. Fondo de cultura económica, México.
65. Lamothe-Zavaleta C., Fredriksson G. y Kindahl H. 1991. Reproductive performance of zebu cattle in Mexico 1. Sexual behavior and seasonal influence on estrous cyclicity. December. Vol. 36. No. 6: 886-896.
66. Larson J. E., Lamb G. C., Funnell B. J., Bird S., Martins A., Rodgers J. C. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. Theriogenology, 73: 698-703.
67. Leibo S. P. y Pool B. T. 2011. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. Fertility and Sterility, 96(2), 269-276.
68. Lehn-Jensen H. y Rall W. F. 1983. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. Theriogenology, 19 (2), 263-277.
69. Lopes da Costa L., Chagas e Silva J. and Robalo Silva J. 2001. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. Theriogenology, 56: 66-77.
70. López B. B., Esperón S. A. E. y Ortiz E. C. I. 2004. Comportamiento de la raza Simmental bajo explotación extensiva en Valparaíso Zacatecas, México. Ed. Revista de Ciencia Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria. Año 1. Vol. 1. Núm. 2 Julio-Diciembre 2004. p 1-5.
71. Macmillan K. L., Segwagwe B. V. E., Pino C. S. 2003. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. Animal Reproduction Science, 78: 327-344.
72. Manual Merck de Veterinaria (1988). 3era Edición en español. Ed. Centrum. España. 1918 p.

73. Márquez Y., Galina S. C., Moreno N., Ruiz, H., Ruiz A., Merchant H. 2005. Evidence of a seasonal effect on the quality of embryos produced assessed by their resistance to freezing and thawing and their degree of apoptosis. *Reproduction. Domestic Animal*, 40: 553-558.
74. Martin B., Golden E., Carlson D. O., Egan M. J., Mattson P. M., Maudsley S. 2008. Caloric restriction: Impact upon pituitary function and reproduction. *Ageing Research Reviews*, 7: 209-224.
75. Martínez R. V. 1994. Efecto de la época de parto sobre la eficiencia reproductiva del ganado cebú en el trópico seco. Tesis Licenciatura. UNAM. FES-C. México. P 49.
76. Martínez G. J. C., Castillo R. S. P. y Gonzáles R. A. 2004. Reproducción de Vacas Brahman en el trópico tamaulipeco. *Memorias del 3er Seminario Internacional de Reproducción Animal y Producción de Leche y Carne*. UAM, Xochimilco. México. D. F. p 257-260.
77. Monteiro M. F., Melo S. D., Ferreira G. M. M., Carvalho M. L., Sartoreli e S. E., Ederhardt G. B., Nogueira de P. G., Barros M. C. 2009. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. *Animal Reproduction Science*, 110: 128-138.
78. Morton J. M., Tranter W. P., Mayer D. G. and Jonsson N. N. 2007. Effects of environmental heat on conception rates in lactating dairy cows: critical periods of exposure. *Journal Dairy Science*. 90: 2271–2278.
79. Mosqueda J. J. Figueroa J. V., Álvarez J. A., Ramos J. A., Rojas E. E. 2004. Generalidades de la Babesiosis Bovina, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología.
80. Nasser F. L. Reis L. E. Oliveira A. M. Bo´ A. G. Baruselli S. P. 2004. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine

- embryo transfer in *Bos indicus* X *Bos taurus* recipients. *Theriogenology*, 62: 1577-1584.
81. Niemann H. 1985. Freezing of bovine embryos: of a one-step addition of 1.4 m glycerol. *Theriogenology*, February. 23(2):369-379.
82. Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, Vol. 35(1): 109-124.
83. Noriega S. R., Martínez B. S. y Flores C. R. 1995. Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. UNAM. FMVZ. División del Sistema de Universidad Abierta y Educación a Distancia. 1ª Edición. P 67.
84. Nogueira G. P. 2004. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Animal Reproduction Science*, Vol. 82-83, p 361-372.
85. Nogueira M. F. G., Melo D. S., Carvalho L. M., Fuck E. J., Trinca L.A. and Barros C. M. 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 $\alpha$  and eCG? *Theriogenology*, 61 (7/8), 1283-1290.
86. Orihuela A. 2000. Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. *Applied Animal Behaviour Science*, 70: 1-16.
87. Padmanabhan V. y Sharma T. P. 2001. Neuroendocrine vs. Paracrine Control of Follicle-Stimulating Hormone. *Archives of Medical Research*, 32: 533-543.
88. Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012. Disponible en <http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/igualdad-de-oportunidades/superacion-de-la-pobreza.html>
89. Pontes J. H. F., Melo S. F. A., Basso A. C., Ferreira C. R., Sanches B. V., Rubin K. C. P. y Seneda M. M. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production and pregnancy rates from a large-scale

- commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75: 1640-1646.
90. Preciado de la T. J. F., Rojas R. E. E., García O. M. A., Rodríguez S. D. 2004. Control y Tratamiento de la Anaplasmosis Bovina. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Jiutepec, Morelos, México. INIFAP. Publicación Técnica N° 1. 10 P.
91. Rall W. F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science*, 28: 237-245.
92. Reis E. L., Nasser L. F.T., Menegatti J. A., Resende L. F., Mantovani A. P. y Baruselli P. S. 2004. Effect of time and dose of eCG treatment in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients treated with progesterone for timed embryo transfer. In 'Proceedings of the 15th International Congress of Animal Reproduction'. (Eds P. K. Basrur, P. J. Broadbent, M. Henry and L. E. Pinheiro.) p. 395. (Elsevier: Porto Seguro, Brazil.) [Abstract].
93. Rizos D. W., Boland M. P. F. y Lonergan P. 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, 56: 1-16.
94. SAGARPA. 2005. La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en <http://www.sagar.gob.mx>.
95. Santiago C. A., Voge J. L., Aad P. Y., Allen D. T., Stein D. R., Malayer J. R., Spicer L. J. 2005. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 28: 46-63.
96. Sartori R. y Barros C. M. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124: 244-250.

97. Segura C. J. 1987. Diagnóstico de la ganadería bovina en el estado de Yucatán (Tesis maestría). México: CSAT.
98. Segura C. J. 1987. Intervalo entre partos de un hato Gyr en Tamaulipas. Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Buiatría y XIII Congreso Nacional de Buiatría. México. p 63-67.
99. Seidel Jr. E. G. and Seidel M. S. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Production and Health paper 77. <http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E00.HTM>
100. Seidel Jr. E. G. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation Theriogenology, 65: 228-235.
101. SIAP. 2004. Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en <http://www.siap.sagarpa-gob.mx>.
102. Schiewe M. C., Looney C. R., Johnson C. A., Hill K.G. y Godke. R. A. 1987. Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated beef cattle. Theriogenology, October. Vol. 28(4): 395-406.
103. Simões A. L. R., Satrapa R. A., Rosa S. F., Piagentini M., Castilho C.S A., Ereno L R., Trinca A. L., Nogueira F.G. M., Buratini Jr. J., Barros M. C. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. Theriogenology, 77(1): 139-147.
104. Siqueira L. G. B., Torres, C. A. A., Souza E. D., Monteiro Jr. P. L. J., Arashiro E. K. N., Camargo L. S. A., Fernandes, C. A. C. y Viana J. H. M. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. Theriogenology, 72: 949-958.
105. Smorag Z., Katska L. y Wierzchos E. 1981. Some factors affecting the viability of mouse and cattle embryos frozen to - 40 °C

- before transfer to liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*, 4: 65-72.
106. Solano J., Orihuela A., Galina C. S., Montiel F., Galindo F. 2005. Relationships between social behaviour and mounting activity of Zebu cattle (*Bos indicus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 94: 197-203.
107. Sorensen Jr. A. M. 1979. *Reproducción Animal Principios y Prácticas*. 1era Edición. Ed. McGraw-Hill. México. 539.
108. Spell A. R., Beal W. E., Corah L. R. y Lamb G. C. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56: 287-297.
109. Stinshoff H., Wilkening S., Hanstedt A. y Brüning K. 2011. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, V. 76, Issue 8, November. P. 1433-1441.
110. Sudano M. J., Landim-Alvarenga F. C., Sartori R., Machado R. 2011. Reuse of norgestomet implants in an eCG-based superovulation protocol administered to Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. *Livestock Science*, 141(2): 207-212.
111. Suzuki T., Sakai Y., Miurah T., Ishida S., Matsuda. H. y Itoh. K. 1989. Induction of twinning in ipsilateral frozen crossbred heifers by embryo transfer. *Theriogenology*, April 31(4): 917-926.
112. Thibier M. 2008. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter*, 4: 4-9.
113. Torres-Júnior R. S., Sá Filho M. F., Gimenes L. U., Madureira E. H., Baruselli P. S. 2005. Effect of PGF2 administration at Norgestomet implant insertion on follicular dynamics in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Act Science Veterinary*, 33, p. 222.

114. Vélez M., Hincapié J., Matamoros I. y Santillán R. 2002. Producción de ganado lechero en el trópico. 4ª Edición. Zamorano, Academia Press. Zamorano, Honduras. p 203-206.
115. Wallace L. D. Breiner C. A. Breiner R. A. Spell A. R. Carter J. A. Lamb G. C. y Stevenson J. S. 2011. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology*, 75: 1506-1515.
116. Yavas Y. y Walton J. S. 2000. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, 54: 1-23.